



**Hugo Filipe Nunes Monteiro**

Licenciado em Bioquímica

**Estudo da interação de flavílios com ácidos  
nucleicos.**

**Dissertação para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica**

Orientador: Doutor Jorge Parola

Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade Nova de Lisboa

Coorientadora: Doutora Letícia Giestas

Faculdade de Ciências e Tecnologias- Universidade Nova de Lisboa

## **Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos.**

Copyright © Hugo Filipe Nunes Monteiro, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

***Para ti, Avô!***

# Resumo

---

O presente trabalho tem como objetivo principal o estudo de interação de compostos flavílicos com ácidos nucleicos. Primariamente foram estudadas as cinéticas da estabilidade de 5 flavílios (1- 7-(N,N-dietilamino)-4'-hidroxiflavilo; 2- 7-julol-4'-OH; 3- 7-(dietilamina)-2-(p-tolil)cromenilo; 4- 7-(dietilamina)-2-(4-(dietilamina)fenil)cromonelio; 5- 1-(4-(7-(dietilamina)cromenilio-2-il)benzil)-1'-metil-[4,4'-bipiridina]-1,1'-Dio), a pH=5, de modo a proceder-se ao estudo de interações entre os 5 flavílios e 4 ácidos nucleicos (ctDNA; Poly (A: U); Poly (G: C); Poly (A: T)). As titulações realizadas com auxílio da espectroscopia de Uv-Vis, indicam que os flavílios possuem uma interação com os ácidos nucleicos, sendo de assinalar que o flavílio 5 na presença de ctDNA, por emissão, apresenta resultados bastante diferentes dos observados nas restantes titulações o que poderá ser indicativo de que a interação gerada pela presença de ácido nucleico em solução com o flavílio 5 é diferente das observadas nos resultados obtidos nas restantes titulações. De modo a complementar este estudo, foram ainda realizados os cálculos das constantes de associação entre os flavílios e os ácidos nucleicos através da aplicação de ajustes matemáticos pelos métodos de *Scatchard*, *Langmuir*, *McGhee - von Hippel* e derivados do modelo de *Scatchard* mas não foi possível obter valores de constantes de associação concretos, sendo que este último apresenta resultados mais próximos dos observados na literatura de estudo de interações de compostos com ácidos nucleicos. Foram também medidos os tempos de vida dos flavílios na ausência/presença de Poly (A: U) e ctDNA (1- 277 ps; 2- 164 ps; 3- ~200 ps; 4-~ 172 ps; 5-~ 174 ps) visualizando-se um aumento do tempo de vida do flavílio quando na presença de ácido nucleico. Para além das experiências enunciadas, foram realizadas titulações dos flavílios 7-(N,N-dietilamino)-4'-hidroxiflavilo e 7-julol-4'-OH com ctDNA e Poly (A: U) com recurso à espectroscopia de RMN (1D  $H^+$  RMN), sendo visível que o flavílio 7-julol-4'-OH possui uma maior afinidade para com o ctDNA e o 7-(N,N-dietilamino)-4'-hidroxiflavilo apresenta maior afinidade com o Poly (A: U). Estudos realizados sobre a estabilidade de ctDNA e Poly (A: U) na presença flavílios a 260nm, indicam que a presença do flavílio em solução altera a estabilidade dos ácidos nucleicos, sendo esse resultado perentório para o flavílio 1-(4-(7-(dietilamina)cromenilio-2-il)benzil)-1'-metil-[4,4'-bipiridina]-1,1'-Dio). Por último, foram realizados ensaios de dicroísmo circular, com o intuito de observar a interação entre os flavílios e os ácidos nucleicos, não sendo de todo conclusivos os resultados obtidos mas podendo, novamente, destacar o comportamento observado pelo flavílio 5.

# Abstract

---

This work has as main objective the study of interaction flavylum compounds with nucleic acids. Primarily the kinetic stability of 5 flavylum compounds (1-7- (N, N-diethylamine) -4'-hydroxyflavylum; 2- 7-julol-4'-OH; 7- 3- (diethylamine) -2- (p-tolyl) chromenyl; 4- 7- (diethylamine) -2- (4- (diethylamine) phenyl) cromonelio; 5- 1- (4- (7- (diethylamine) cromenilio-2-yl) benzyl) -1'-methyl- [4,4'-bipyridine] -1,1'-dione) were studied at pH = 5, to proceed to the study of interactions between the flavylum and 4 nucleic acid ctDNA; Poly (A: U); Poly (G: C); Poly (A: T)). Titers em-bodiments with the aid of UV-Vis spectroscopy indicate that the post-flavylum to sweat an inter-action with the nucleic acids being noted that the flavylum 5 in the presence of ctDNA for emis-sion, has quite different results observed in resented by titrations which may be indicative that the interaction caused by the presence of nucleic acid in solution with the flavylum 5 is different from the displaying of the results obtained in other titrations. In order to complement this study, we also carried out the calculations of the association constants between flaylium compounds and nucleic acids by applying tion of mathematical adjustments by the methods of Scatchard, Langmuir, McGhee - von Hippel and some derivated models of *Scatchard* model but it was not possible to obtain concrete association of constant values. The best values obtain from the meth-ods are associated with the Scatchard plots. the Life times of the flavylum were also measured in the absence / presence of Poly (A: U) ctDNA (1- 277 ps; 2- 164 ps; 3-  $\approx$ 200 ps; 4- $\approx$  172 ps; 5-  $\approx$  174 ps) and visualizing an increased lifetime of flavylum when titrated with nucleic acid. In addition to the stated experiments, titrations were performed flavylum of 7- (N, N-diethylamino) -4'-hidroxiflavylum and 7-julol-4'-OH with ctDNA and poly (A: U) using the NMR spetroscopie (1D H<sup>+</sup> NMR) being visible that the flavylum-7-julol 4'-OH has a higher affinity for the ctDNA and 7- (N, N-diethylamine) -4'-hidroxiflavilo is more afinida with the Poly- (A: U). Studies on the stability of ctDNA and poly (A: U) in the pre-sence flavylum at 260nm, indicating the presence in solution of flavylum alter the stability of nucleic acids, this being illustrated by the result for the flavylum 1- (4-7- (diethylamine) cromenilio-2-yl) benzyl) -1'-methyl- [4,4'-bipyridine] -1,1'-dione). Finally, circular dichroism were zados realitest in order to observe the interaction between flavylum and nucleic acids and is not conclusive of all the results obtained.

# Agradecimentos

---

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer ao Doutor Jorge Parola e Doutora Letícia Giestas pela disponibilidade, apoio demonstrado, auxílio e acima de tudo pela compreensão manifestada ao longo deste último ano.

Gostaria de agradecer a tudo o grupo de Fotoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa pela forma como recebem os novos alunos assim como a forma com que os integram e os colocam à vontade. Neste caso, faço um agradecimento especial ao Tiago Moreira por toda a ajuda prestada ao longo deste último ano.

Gostaria de agradecer ao auxílio prestado nas parcerias que possibilitaram a realização de experiências de RMN e CD, sendo um agradecimento especial reservado para o Micael Silva.

A vocês meus pais, só tenho um enorme obrigado por tudo o esforço e dedicação que fizeram para que este momento fosse possível, nunca irei esquecer tal gesto! Obrigado Mãe (Idalina Nunes) por seres a pessoa que melhor me compreende e a pessoa que mais acredita em mim neste mundo e nunca me teres deixado de desistir mesmo quando esse é o sentimento que nos mais apodera. Obrigado Pai (Vitor Monteiro) por seres um exemplo da luta pela conquista dos nossos sonhos e obrigado por seres como és e por sentires orgulho em mim!

Aos meus irmãos, Tiago Monteiro e Tânia Monteiro, por acreditarem nas minhas capacidades e me darem força neste caminho, assim como à minha pequenina afilhada (Bárbara Monteiro) que pela sua presença me ajudou a orientar e a organizar aspetos extratrabalho.

Aos meus amigos por todo o apoio prestado ao longo destes últimos 6 anos e por saber que convosco poderei sempre contar. Um agradecimento em Especial para a Marta e o velhote Tiago, por terem sido grandes companheiros nesta jornada e ao Micael Silva por toda a disponibilidade apresentado e ajuda prestada.

A ti, Filipa Quinaz, Obrigado! Obrigado por seres a pessoa que és, por acreditares em mim, por não me deixares ir abaixo, por me aturares quer nos bons, quer nos maus momentos, mas acima de tudo, obrigado por seres o que representas para mim! És tudo garota!

Por último, mas não menos importante, a ti meu avô! Muitos anos passaram desde o momento em que partiste, mas nunca te esquecerei e deixar de dar o valor que mereces na minha vida, olha por nós!

# Índice

Resumo .....	iii
Abstract .....	iv
Agradecimentos.....	v
Índice de Figuras .....	viii
Índice de Tabelas .....	xii
I- Introdução .....	1
I.1- Ácidos Nucleicos.....	3
I.1.1- As componentes da unidade da vida.....	3
I.1.2- Bases do DNA e RNA .....	5
I.1.3- Paridade entre bases e dupla hélice.....	5
I.1.4- As conformações do DNA.....	8
I.1.5- Estabilidade do DNA .....	9
I.2- Flavonoides.....	10
I.2.1 -Química dos flavonoides.....	12
I.3- Antocianinas.....	13
I.3.1- A química e estabilidade das antocianinas.....	13
I.4- Flavílios .....	14
I.4.1 Rede química e propriedades dos Flavílios .....	16
II- Materiais e metodologias .....	20
II.1- Flavílios em estudo .....	21
Flavílio 1: .....	21
Flavílio 2: .....	22
Flavílio 3: .....	22
Flavílio 4: .....	23
Flavílio 5: .....	24
II.2- Ácidos nucleicos .....	26
II.3- Espectroscopia Ultravioleta-Visível e Fluorescência.....	27
II.4- Fluorescência.....	31
II.5- Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	32
II.6- Tempos de vida.....	33
II.7- Dicroísmo circular.....	34
II.8- Constantes de associação.....	35
III-Procedimento experimental .....	38

III.1-Estudo de estabilidade dos flavílios .....	39
III.2- Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos.....	39
III.3- Estudo de interação por RMN.....	41
III.4- Tempos de vida.....	43
III.5- Estudo da estabilidade de ácidos nucleicos na presença de Flavílios. ....	44
III. 6-Dicoísmo circular .....	44
IV- Resultados e discussão.....	45
IV.1- Estabilidade dos compostos flavílicos. ....	47
IV.1.1 Flavílio 1:.....	47
IV.1.2- Flavílio 2:.....	48
IV.1.3- Flavílio 3:.....	52
IV.1.4- Flavílio 4:.....	53
IV.1.5- Flavílio 5:.....	54
IV.2- Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos .....	55
IV.2.1- Flavílio 1:.....	56
IV.2.2- Flavílio 2:.....	61
IV.2.3- Flavílio 3:.....	64
IV.2.4- Flavílio 4:.....	66
IV.2.5- Flavílio 5:.....	68
IV.2.6- Constantes de associação.....	72
IV.3- Estudo de interação por RMN .....	76
IV.3.1- Flavílio 1.....	76
IV.3.2- Flavílio 2.....	81
IV.3.3- Competição.....	86
IV.4- Tempos de Vida.....	87
IV.4.1- Flavílio 1:.....	87
IV.4.2- Flavílio 2:.....	88
IV.4.3- Flavílio 3:.....	90
IV.4.4- Flavílio 4:.....	92
IV.4.5- Flavílio 5:.....	93
IV.5- Estudo da estabilidade de ácidos nucleicos na presença de Flavílios. ....	94
IV.6- Dicroísmo circular .....	98
V- Conclusões .....	100
IV- Bibliografia .....	103
VII- Anexos .....	107



# Índice de Figuras

FIGURA 1- REPRESENTAÇÃO DE UM NUCLEOTÍDEO.....	3
FIGURA 2- ESTRUTURA DAS PENTOSE DESOXIRRIBOSE E RIBOSE.....	4
FIGURA 3- REPRESENTAÇÃO DA ESTRUTURA DE UM MONÓMERO DE ÁCIDO NUCLEICO <sup>2</sup> .....	4
FIGURA 4- BASES PÚRICAS.....	5
FIGURA 5- BASES PIRIMÍDICAS.....	5
FIGURA 6- INTERAÇÕES ENTRE GUANINA E CITOSINA.....	6
FIGURA 7- INTERAÇÕES ENTRE ADENINA E TIMINA.....	6
FIGURA 8- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA LOCALIZAÇÃO DO <i>MAJOR</i> E <i>MINOR GROOVE</i> NOS PARES DE BASES. <sup>6</sup> .....	8
FIGURA 9- REPRESENTAÇÃO DAS 3 FORMAS MAIS COMUNS DE DNA <sup>6</sup> .....	9
FIGURA 10- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DE UMA EXPERIÊNCIA DE MELTING. A AZUL ESTÁ REPRESENTADO A DESNATURAÇÃO DE UMA MOLÉCULA DE DNA E A VERMELHO ESTÁ A REPRESENTAÇÃO DE UMA CADEIA COM ALTO TEOR EM G-C. <sup>14</sup> .....	10
FIGURA 11- REPRESENTAÇÃO DA VIA FENILPROPANOÍDE, ADAPTADO <sup>18</sup> .....	11
FIGURA 12- ESTRUTURA BASE DE UM FLAVENÓIDE <sup>16, 17</sup> .....	12
FIGURA 13- CLASSIFICAÇÃO DAS CLASSES DE FLAVONÓIDES <sup>16, 17</sup> .....	12
FIGURA 14- COMPOSTOS BENZOPIRILICOS DERIVADOS DE ANTOCIANINAS. <sup>21-23</sup> .....	13
FIGURA 15- REDE DE REAÇÕES QUÍMICAS DE UM FLAVÍLIO COM BASE NO EQUILÍBRIO DE 4'-HIDROXIOFLAVÍLIO. <sup>20, 21, 23, 26</sup> .....	15
FIGURA 16- DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES TEÓRICA E EQUAÇÕES ASSOCIADAS.....	16
<b>FIGURA 17- TERMODINÂMICA DE UM SISTEMA GERAL FLAVÍLIO.</b> .....	17
FIGURA 18- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPETRO DO FLAVÍLIO 1 (ESQUERDA) E DA ESTRUTURA DO COMPOSTO (DIREITA). ....	21
FIGURA 19- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPETRO DO FLAVÍLIO 2 (ESQUERDA) E DA ESTRUTURA DO COMPOSTO (DIREITA). ....	22
FIGURA 20- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPETRO DO FLAVÍLIO 3 (ESQUERDA) E DA ESTRUTURA DO COMPOSTO (DIREITA). ....	23
FIGURA 21- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPETRO DO FLAVÍLIO 4 (ESQUERDA) E DA ESTRUTURA DO COMPOSTO (DIREITA). ....	24
FIGURA 22- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESPETRO DO FLAVÍLIO 5 (ESQUERDA) E DA ESTRUTURA DO COMPOSTO (DIREITA). ....	25
FIGURA 23- ESPETRO DA RADIAÇÃO ELETROMAGNÉTICA (REF).....	27
FIGURA 24- REPRESENTAÇÃO DO COMPORTAMENTO DA LUZ. ASSOCIADO AO CAMPO ELÉTRICO ESTÁ UM CAMPO MAGNÉTICO.....	27
FIGURA 25- TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS APÓS PULSO DE ENERGIA <sup>30</sup> .....	28
FIGURA 26- IMAGEM ILUSTRATIVA DAS SOLUÇÕES PREPARADAS. DA ESQUERDA PARA A DIREITA ENCONTRA-SE DE FORMA NUMÉRICA CRESCENTE AS SOLUÇÕES DE FLAVÍLIOS UTILIZADOS (1 A 5). ....	29

FIGURA 27- INFLUÊNCIA DO SOLVENTE NO DESVIO QUÍMICO OBSERVADO TANTO POR ABSORÇÃO COMO POR EMISSÃO. ....	30
FIGURA 28- ESTABILIZAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 A PH=5 AO LONGO DO TEMPO.....	47
FIGURA 29- EVOLUÇÃO DA ESTABILIDADE DO FLAVÍLIO AO LONGO DO TEMPO A 529 NM. ....	48
FIGURA 30- EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO 2 A PH=2,41 .....	49
FIGURA 31- EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO 2 A PH=5,53 .....	49
FIGURA 32- DISTRIBUIÇÃO DE ESPÉCIES DO FLAVÍLIO 2 <sup>28</sup> .....	50
FIGURA 33- MONITORIZAÇÃO DA EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO A PH=11,4.....	50
FIGURA 34- DIFERENTES ESTADOS DAS ESPÉCIES DO FLAVÍLIO 2. <sup>28</sup> .....	51
FIGURA 35- EVOLUÇÃO DAS ESPÉCIES A DIFERENTES PH ENTRE AS 0 HORAS (ESQUERDA) E 120 HORAS (DIREITA).....	51
FIGURA 36- ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO 3 AO LONGO DO TEMPO APÓS O SALTO DE PH.....	52
FIGURA 37- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS ESPETROS OBTIDOS NO ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO 4 AO LONGO DO TEMPO AQUANDO DO SALTO DE PH. ....	53
FIGURA 38- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DO ESTUDO DA EVOLUÇÃO DO FLAVÍLIO 5 AO LONGO DO TEMPO A PH=5. ....	54
FIGURA 39- SOBRESPOSIÇÃO DOS ESPETROS OBTIDOS DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: U) .....	56
FIGURA 40- SOBRESPOSIÇÃO DOS ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA OBTIDOS NA TITULAÇÃO COM POLY (A: U).....	57
FIGURA 41- VARIAÇÃO DA ABSORVÂNCIA (530 NM) E INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (544 NM) AO LONGO DA TITULAÇÃO. ....	57
FIGURA 42- SOBRESPOSIÇÃO GRÁFICA DOS ESPETROS DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM CTDNA. ....	58
FIGURA 43- A) SOBRESPOSIÇÃO DOS ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA OBTIDOS NA TITULAÇÃO COM CTDNA. B) VARIAÇÃO DA INTENSIDADE DE FLUORESCÊNCIA (607 NM) E DE ABSORÇÃO (530 NM) AO LONGO DA TITULAÇÃO. ....	59
FIGURA 44- SOBRESPOSIÇÃO GRÁFICA DOS ESPETROS DE ABSORÇÃO OBTIDOS NA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: T). ....	60
FIGURA 45- ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: T).60	
FIGURA 46- ESPETROS DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM POLY (A: U). ....	61
FIGURA 47- ESPETROS DE FLUORESCÊNCIA OBTIDOS AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM POLY (A: U). ....	62
FIGURA 48- TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA POR UV-VIS. ....	62
FIGURA 49- TITULAÇÃO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA POR FLUORESCÊNCIA. ....	63
FIGURA 50- A) ESPETROS DE ABSORÇÃO E B) ESPETROS DE EMISSÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 3 COM POLY (A: U). ....	64
FIGURA 51- TITULAÇÃO FLAVÍLIO 3 COM CTDNA POR UV-VIS. ....	65
FIGURA 52- ESPETROS DE EMISSÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 3 COM CTDNA. ....	65
FIGURA 53- TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 4 COM POLY (A: U) POR UV-VIS.....	66

FIGURA 54- EMISSÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 4 COM POLY (A: U).....	67
FIGURA 55- TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 4 COM CTDNA (UV-Vis.) .....	67
FIGURA 56- ESPETROS DE EMISSÃO AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 4 COM CTDNA.....	68
FIGURA 57- ESPETROS DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 5 COM POLY (A: U). ....	69
FIGURA 58- ESPETROS DE EMISSÃO AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 5 COM POLY (A: U).....	69
FIGURA 59- SOBREPOSIÇÃO DOS ESPETROS DE ABSORÇÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 5 COM CTDNA. .....	70
FIGURA 60- ESPETROS DE EMISSÃO OBTIDOS NA TITULAÇÃO DE CTDNA E FLAVÍLIO 5. ....	71
FIGURA 61- AJUSTE DE SCATCHARD PARA O FLAVÍLIO 3 COM CTDNA.....	73
FIGURA 62- AJUSTE DE <i>VON HIPPEL</i> FLAVÍLIO 3 COM CTDNA. A) AJUSTE REALIZADO ATÉ A $1,5 \times 10^{-4}$ . B) AJUSTE COM TODOS OS PONTOS EXPERIMENTAIS.....	74
FIGURA 63- AJUSTE ÓBTIDO POR AJUSTES DERIVADOS DO MÉTODO DE <i>SCATCHARD</i> . ....	75
FIGURA 64- ESTRUTURA DO FLAVÍLIO 1 E INDICAÇÃO DOS DESVIOS QUÍMICOS DOS PROTÕES DO COMPOSTO.....	76
FIGURA 65- ESPETROS DE PROTÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM CTDNA- PONTOS INICIAIS.....	77
FIGURA 66-ESPETROS DE PROTÃO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM CTDNA- PONTOS FINAIS.....	77
FIGURA 67- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM CTDNA. ESTÃO LOCALIZADOS A VERMELHO OS PROTÕES QUE POSSUEM UMA AFINIDADE MAIOR PARA COM O ÁCIDO NUCLEICO, A LARANJA OS QUE POSSUEM UMA AFINIDADE INTERMÉDIA E A VERDE OS PROTÕES QUE NÃO INTERAGEM COM O ÁCIDO NUCLEICO. ....	78
FIGURA 68- RELAÇÃO DOS RÁCIOS DE INTENSIDADE OBSERVADOS COM A CONCENTRAÇÃO DE CTDNA AO LONGO DA TITULAÇÃO. ....	78
FIGURA 69- ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: U )- PONTOS INICIAIS. .....	79
FIGURA 70-ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: U )- PONTOS FINAIS..	79
FIGURA 71- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 1 COM POLY (A: U). A VERMELHO ENCONTRAM-SE LOCALIZADAS AS REGIÕES QUE INTERAGEM COM POLY (A: U) E A VERDE AS QUE POSSUEM MENOR AFINIDADE PARA COM O MESMO. ....	80
FIGURA 72- RELAÇÃO DOS RÁCIOS DE INTENSIDADE OBSERVADOS COM A CONCENTRAÇÃO DE POLY (A: U) AO LONGO DA TITULAÇÃO.....	80
FIGURA 73- ESTRUTURA DO FLAVÍLIO 2 E INDICAÇÃO DOS DESVIOS QUÍMICOS DOS PROTÕES DO COMPOSTO.....	81
FIGURA 74-ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA- PONTOS FINAIS. ....	81
FIGURA 75- ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA- PONTOS FINAIS.....	82
FIGURA 76- REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA. A VERMELHO ENCONTRAM-SE LOCALIZADAS AS REGIÕES QUE POSSUEM AFINIDADE COM O ÁCIDO NUCLEICO. ....	82
FIGURA 77- RÁCIOS DAS INTENSIDADES DOS DIFERENTES PROTÕES AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA. ....	83

FIGURA 78- ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM POLY (A: U )- PONTOS INICIAIS.	83
FIGURA 79- ESPETROS 1D H RMN DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM POLY (A: U )- PONTOS FINAIS.	84
FIGURA 80- RÁCIOS DAS INTENSIDADES DOS DIFERENTES PROTÕES AO LONGO DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM POLY (A: U).	84
FIGURA 81- DECAIMENTOS OBSERVADOS DO FLAVÍLIO ( <i>PROMPT</i> ), DO FLÁVILIO COM 120 $\mu$ M DE POLY (A: U) ( <i>DECAY</i> ), O AJUSTE (FIT) E RESÍDUOS (CANTO SUPERIOR DIREITO)	88
FIGURA 82- DECAIMENTOS OBSERVADOS DO FLAVÍLIO NA AUSÊNCIA/ PRESENÇA DE POLY (A: U) (120 $\mu$ M).	89
FIGURA 83- AJUSTES OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS MEDIÇÕES DE TEMPERATURA DE <i>MELTING</i> .	94
FIGURA 84- REPRESENTAÇÃO GRÁFICA DOS AJUSTES FEITOS COM OS RESULTADOS ÓBTIDOS NA MEDIÇÃO DE T <sub>M</sub> DE CTDNA.	96
FIGURA 85- FLAVÍLIO 3 COM POLY (A: U).	98
FIGURA 86- FLAVÍLIO 5 COM POLY (A: U).	99
FIGURA 87- FLAVÍLIO 5 COM CTDNA.	99

# Índice de Tabelas

TABELA 1- REPRESENTAÇÃO DAS DIFERENTES CLASSES DE ANTOCIANINAS <sup>24</sup> .....	14
TABELA 2- FAVÍLIOS UTILIZADOS EM ESTUDO.....	19
TABELA 3- TIPOS DE OLIGOS UTILIZADOS NO TRABALHO.....	26
TABELA 4- VALORES DE ADIÇÃO DE POLY (A: U) PARA OS CINCO FLAVÍLIOS.....	40
TABELA 5- CONCENTRAÇÕES E VOLUMES A ADICIONAR DE CTDNA NAS TITULAÇÕES COM OS 5 FLAVÍLIOS. .....	40
TABELA 6- CONCENTRAÇÕES E VOLUMES A ADICIONAR DE POLY DA.DT NAS TITULAÇÕES COM OS 5 FLAVÍLIOS;* -REPRESENTA O PONTO FINAL DA TITULAÇÃO COM O FLAVÍLIO 2;**- REFERE-SE AO PONTO FINAL DA TITULAÇÃO PARA O FLAVÍLIO 3,4 E 5 ;***- REFERE-SE AO FINAL DA TITULAÇÃO COM O FLAVÍLIO 1. ....	41
TABELA 7- CONCENTRAÇÕES E VOLUMES A ADICIONAR DE POLY (G: C) NAS TITULAÇÕES COM OS 5 FLAVÍLIOS.* FINAL DA TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 5. ....	41
TABELA 8- TITULÇÃO FO FLAVÍLIO 1 COM CTDNA.....	42
TABELA 9- TITULAÇÃO COM POLY (A: U) PARA O FLAVÍLIO 1 E 2.....	42
TABELA 10- TITULAÇÃO DO FLAVÍLIO 2 COM CTDNA.....	43
TABELA 11- RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO COM POLY (A: U).....	71
TABELA 12- RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA TITULAÇÃO COM CTDNA.....	72
TABELA 13- CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (K) OBTIDAS A PARTIR DOS DADOS DE ABSORÇÃO, OBTIDOS ATRAVÉS DO AJUSTE DE LANGMUIR.....	72
TABELA 14- CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (K) OBTIDAS A PARTIR DOS DADOS DE ABSORÇÃO, OBTIDOS ATRAVÉS DO AJUSTE DE SCATCHARD. ....	73
TABELA 15- CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO (K) OBTIDAS A PARTIR DOS DADOS DE ABSORÇÃO, OBTIDOS ATRAVÉS DO AJUSTE DE MCGHEE - VON HIPPEL.....	74
TABELA 16- CÁLCULO DAS CONSTANTES DE ASSOCIAÇÃO OBTIDOSATRAVÉS MÚLTIPLOS AJUSTES DERIVADOS DO AJUSTE DE SCTACHARD OBTIDOS POR EMISSÃO E ABSORÇÃO.....	74
TABELA 17- INTENSIDADES REGISTRADAS NA EXPERIÊNCIA DE COMPETIÇÃO COM CTDNA- FLAVÍLIO 1.86	
TABELA 18- INTENSIDADES REGISTRADAS NA EXPERIÊNCIA DE COMPETIÇÃO COM CTDNA- FLAVÍLIO 2. 86	
TABELA 19- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 1 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE POLY (A: U).....	87
TABELA 20- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 1 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA.....	88
TABELA 21- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 2 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE POLY (A: U).....	89
TABELA 22- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 2 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA.....	90
TABELA 23- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 3 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE POLY (A: U).....	90
TABELA 24- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 3 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA.....	91
TABELA 25- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 3 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA COM AJUSTE MONO- EXPONENCIAL. ....	91
TABELA 26- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 4 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE POLY (A: U).....	92
TABELA 27- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 4 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA.....	92
TABELA 28- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 5 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE POLY (A: U).....	93

TABELA 29- TEMPOS DE VIDA DO FLAVÍLIO 5 NA AUSÊNCIA/PRESENÇA DE CTDNA.....	93
--	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

A	ADENINA
Abs	Absorvância
C	Citosina
CD	Dicroísmo Circular
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
G	Guanina
M	Molar
mL	Mililitros
mM	milimolar
Nm	nanómetros
Ps	Pico segundos
RNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO
T	TIMINA
T <sub>m</sub>	Temperatura de <i>melting</i>
U	Uracilo
≈	aproximado
μL	Microlitros
μM	Micro Molar

---

## I- Introdução

---





## I.1- Ácidos Nucleicos

A informação genética existente nos seres vivos, encontra-se codificada sob a forma de ácidos nucleicos. Estes são polímeros lineares e cada monómero é constituído por três componentes responsáveis pela formação de um nucleótido: base azotada, um açúcar e uma ligação fosfato (figura 1).

### I.1.1- As componentes da unidade da vida

Os ácidos nucleicos possuem como base uma pentose ou açúcar (ribose ou desoxirribose) ligado a uma base azotada denominando-se de nucleosídeo. Esta ligação, depende do tipo de açúcar a que a base azotada se encontra ligada dando origem a duas unidades essenciais para a vida: o DNA (ácido desoxirribonucleico) ou RNA (ácido ribonucleico) <sup>1</sup>. A presença de um grupo fosfato ligado ao nucleosídeo denomina-se de Nucleótido.

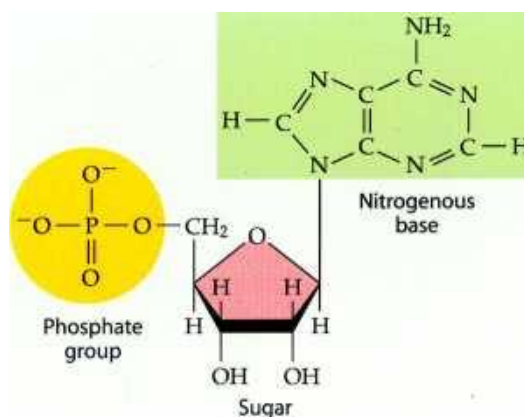
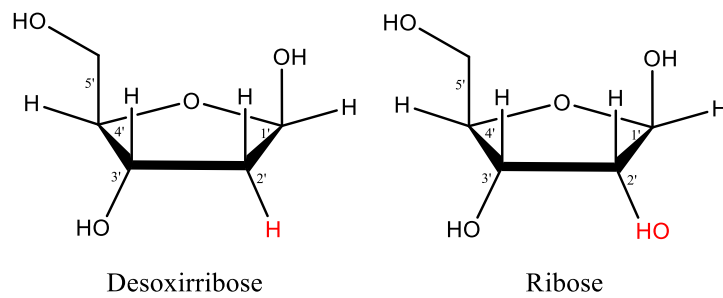


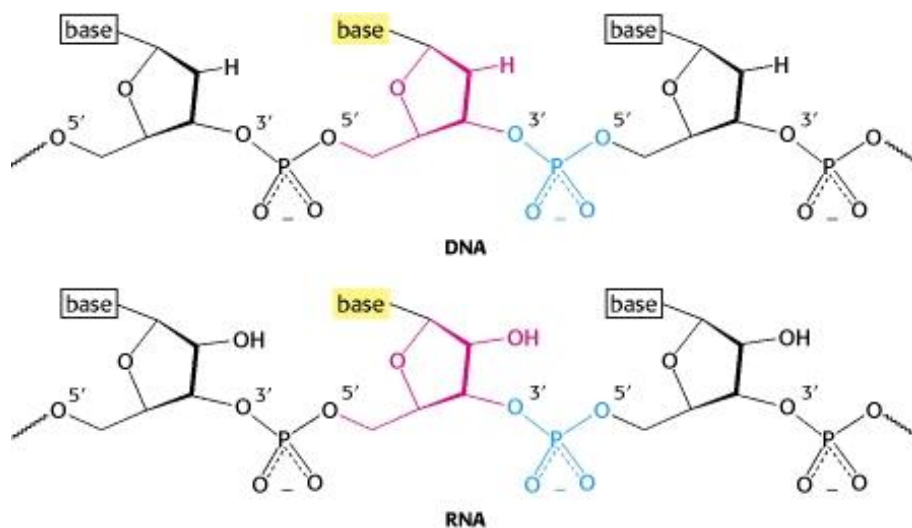
Figura 1- Representação de um Nucleótido.

O açúcar encontra-se ligado covalentemente a uma base azotada na posição 1' para definir que tipo de ácido nucleico é, por consequente, o tipo de base azotada que se encontra ligado (figura 1). No caso do DNA, o açúcar denomina-se de desoxirribose e no caso do RNA de ribose <sup>1</sup>. A diferença entre estes dois açúcares localiza-se na posição 2' onde no caso da ribose existe um grupo hidroxilo, inexistente na desoxirribose (figura 2).



**Figura 2- Estrutura das pentoses desoxirribose e ribose.**

Os açúcares dos ácidos nucleicos são ligados a outros açúcares através de uma ligação fosfodiéster<sup>1</sup>. Essa ligação dá-se nas posições 3'OH (com o açúcar antecedente) e 5' OH (açúcar procedente), formando assim o esqueleto de um ácido nucleico como se encontra esquematizado na figura 3.

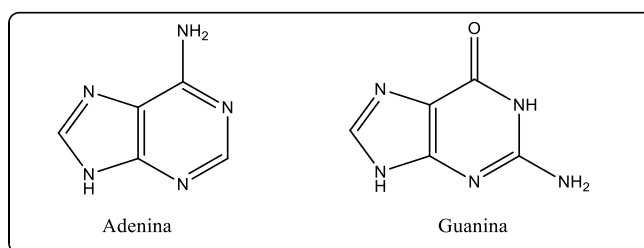


**Figura 3- Representação da estrutura de um monômero de ácido nucleico<sup>2</sup>.**

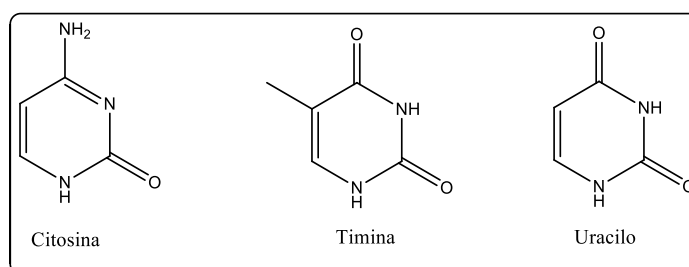
A manutenção da estrutura dos ácidos nucleicos deve-se às propriedades da ligação fosfodiéster. Estas pontes, ao possuírem carga negativa, repelem espécies nucleofílicas, como íons hidróxido, sendo menos suscetíveis a ataques hidrolíticos como acontece com outros ésteres conseguindo manter conservada a informação contida no ácido nucleico.

### I.1.2- Bases do DNA e RNA

As bases azotadas existentes nos ácidos nucleicos podem ser bases púricas (figura 4) ou pirimídicas <sup>1</sup> (figura 5). A grande diferença entre estes dois tipos de base deve-se às púricas possuírem dois anéis adjacentes enquanto que as bases pirimídicas apenas possuem um. As bases pirimídicas são comuns tanto em RNA como em DNA, enquanto que as bases púricas diferem entre Timina (DNA) e Uracilo (RNA) tendo em comum a base Citosina. <sup>1, 3-5</sup>



**Figura 4- Bases púricas.**



**Figura 5- Bases pirimídicas.**

Tanto no DNA como no RNA, a ligação entre o açúcar e a base pirimídica dá-se através do N1 da base azotada com o C1' do açúcar. No caso da base púrica, a ligação é feita entre o N9 da base azotada com o C1' do açúcar.

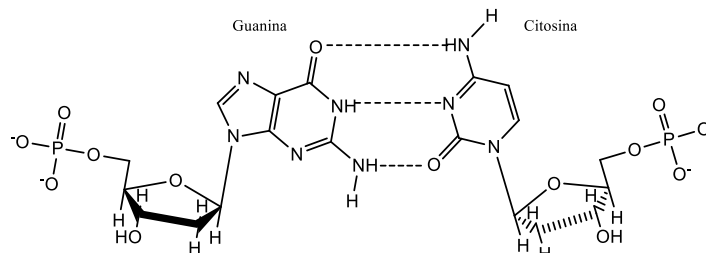
### I.1.3- Paridade entre bases e dupla hélice

Maurice Wilkins e Rosalind Franklin através do estudo por difração de Raios-X com o intuito de determinar a estrutura tridimensional do DNA, observaram a existência de uma intera-

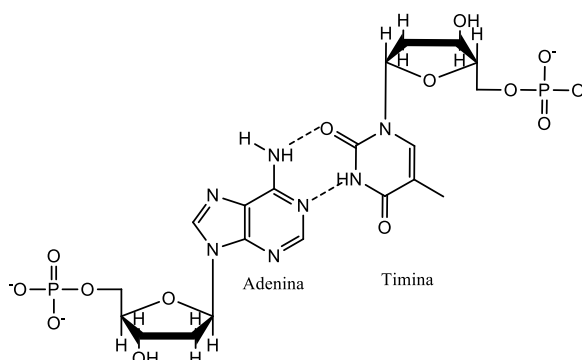
ção específica entre bases e, através dos seus resultados do padrão de difração obtido, concluíram que o DNA era composto por duas cadeias, em sistemas biológicos, formando uma dupla hélice <sup>3</sup>. Mais tarde, com o auxílio destes e outros estudos, James Watson e Francis Crick aferiram o modelo estrutural do DNA, assim como a percepção de que os ácidos nucleicos teriam alguma propriedade funcional. O modelo Watson-Crick <sup>3</sup> para a dupla hélice de DNA, como ficou conhecido, deduzia que:

- 1- A existência de duas cadeias polinucleotídicas helicoides com um eixo em comum, mas com direções opostas;
- 2- Direcionado para o exterior da hélice estão os açúcares ligados ao grupo fosfato e para o interior as bases azotadas;
- 3- As bases encontram-se perto de estarem perpendiculares ao eixo da hélice e as bases adjacentes encontram-se separadas por 3,4 Å<sup>6</sup>.
- 4- Definiram que a estrutura helical repete-se de 34 em 34 Å e que o diâmetro da hélice seria de 20 Å, hoje em dia sabe-se que é de 19,5 Å<sup>6</sup>.

Mais tarde, Watson e Crick detetaram a paridade entre bases: Citosina emparelha com Guanina (figura 6) e Adenina emparelha com Timina (figura 7) <sup>4</sup>. Esta paridade entre bases dá-se através de ligações não covalentes entre si, mais propriamente, Pontes de Hidrogénio.



**Figura 6- Interações entre Guanina e Citosina.**



**Figura 7- Interações entre Adenina e Timina.**

A dupla cadeia de DNA é formada através da estabilização de interações entre duas cadeias simples. A interação entre bases é fundamental para a manutenção da dupla hélice. Zonas ricas em G-C são zonas com uma interação mais forte pois estas interagem através de 3 pontes de hidrogénio enquanto que o emparelhamento entre A e T é feito por duas pontes de hidrogénio, ou seja, locais ricos em G-C são mais estáveis do que locais ricos em A-T <sup>4</sup>. Um exemplo que ilustra bem a importância dos diferentes teores de pares de base e a sua importância no DNA é a replicação do DNA. Na replicação é necessário que haja a separação da dupla cadeia de DNA para possibilitar a ligação de moléculas ao mesmo, como proteínas ou outras moléculas. Estas irão ligar-se em zonas ricas em A-T de modo a possibilitar o desdobramento da dupla hélice e iniciar-se a replicação.

A estabilidade da dupla hélice deve-se à ligação entre bases de 3'-5' que possibilita uma conjugação de fatores que contribuem para a estabilidade do DNA. As bases que se encontram adjacentes são atraídas por forças de Van der Waals, contribuindo para a estabilização da dupla hélice. Outro fator responsável pela estabilização da mesma é a orientação que a molécula de DNA possui, ou seja, existe um efeito hidrofóbico entre bases que resulta na exposição das superfícies mais polares. Tal como nas proteínas, existe uma parte hidrofóbica e outra hidrofílica, sendo que as bases azotadas (parte hidrofóbica) encontram-se orientadas para o interior da dupla hélice e a parte hidrofílica orientada para o exterior. A rigidez e estabilização da dupla hélice também se deve ao possuir açúcares na sua conformação. Estes representam o *backbone* da cadeia e a sua estrutura anelar confere uma maior rigidez á estrutura do DNA.

Na estrutura da dupla hélice de DNA, existem locais classificados como *grooves*<sup>7</sup>. Estas zonas ou cavidades são locais adjacentes aos pares de bases e possibilitam a interação de moléculas com o DNA <sup>8</sup>. Os sulcos não se encontram simetricamente localizados em relação um ao outro e tal leva a que estes possuam tamanho desigual. Os *grooves* formados no DNA são denominados como *major* e *minor Groove*. O *major Groove* (sulco maior) possui uma largura de cerca de 22 Å e o menor de 12 Å.

Como referido anteriormente, a presença de *grooves* na molécula de DNA possibilita a ligação de agentes externos ao DNA, tal como pequenas proteínas e outras moléculas. As bases presentes nos *grooves* irão definir que tipo de interação possa existir nesses locais. O *major groove* apresenta uma cavidade maior para a ligação de moléculas devido a uma maior exposição das bases. Geralmente os fatores de transcrição possuem uma tendência maior para se ligarem no *major Groove* (maior acessibilidade para as bases – Figura 8)). Sendo os *grooves* locais onde outras moléculas podem interagir com o DNA sondas ou agentes terapêuticos podem ser desenhados para interação com o DNA tendo por base a sua especificidade para as bases presentes nestes locais.

Como referido anteriormente, a presença de *grooves* no DNA possibilita a ligação de outras moléculas ao DNA como é o caso de sondas ou agentes terapêuticos devido à sua especificidade de bases nestes locais.

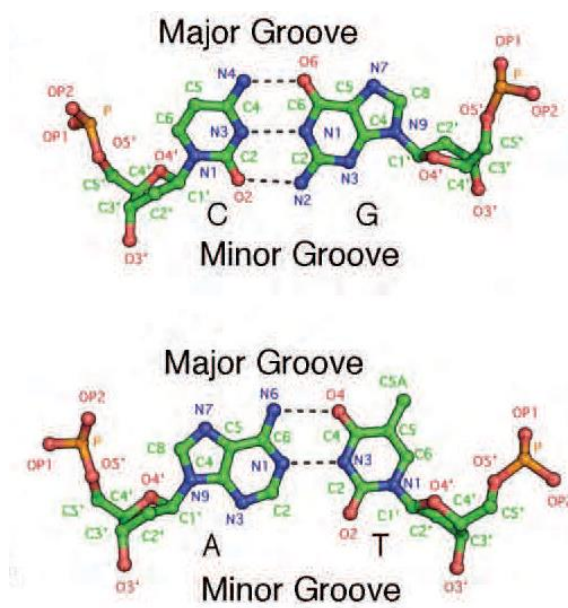


Figura 8- Representação esquemática da localização do *Major* e *Minor groove* nos pares de bases.<sup>6</sup>

#### I.1.4- As conformações do DNA

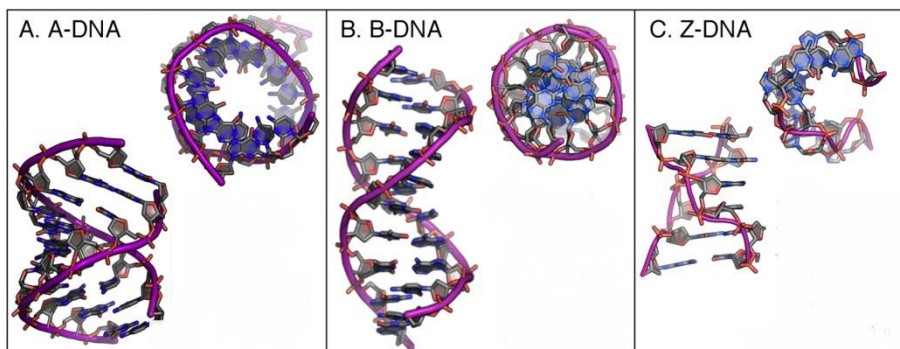
A molécula de DNA pode organizar-se de diferentes maneiras tendo em conta a organização das bases, ou seja, estas irão definir a orientação da rotação da dupla hélice, no ângulo formado pelas bases em relação ao eixo da hélice e a distância necessária para uma rotação completa da hélice. Assim, formam detetadas 3 formas distintas de DNA, A<sup>9</sup>, B<sup>9, 10</sup> e Z<sup>10, 11</sup>, que se encontram representadas na figura 9.

- ➔ Forma A (A-DNA) – Forma mais curta e grossa do DNA. O seu angulo de rotação é para a direita, sendo esta a forma mais curta de DNA necessitando de 11 pares de bases para que a hélice possua uma rotação completa (360°).
- ➔ Forma B (B-DNA) – Tal como a forma A, possui uma rotação orientada para a direita sendo que 10 pares de bases são suficientes para uma rotação completa. A forma B possui como caraterística ser a forma mais longa e fina do DNA.
- ➔ Forma Z (Z-DNA) – A sua rotação é para a esquerda (ao contrário das outras formas) e para completar uma rotação completa sobre o seu eixo, são necessários 12 bases. Este tipo de DNA possui uma conformação mais alongada e fina do que a forma B.

As diferentes formas de DNA não coexistem na Natureza em simultâneo, sendo que as caraterísticas do meio em que encontram irão definir a conformação do DNA. Em solução, o DNA

normalmente assume a conformação B<sup>12</sup> mas ao diminuir-se a água disponível para interação com o DNA, este passa a assumir a forma A-DNA.

No caso da forma Z, o DNA tem tendência a assumir este tipo de conformação quando o meio se encontra com altas concentrações de catiões <sup>10</sup>.



**Figura 9- Representação das 3 formas mais comuns de DNA<sup>6</sup>.**

### **I.1.5- Estabilidade do DNA**

A estabilidade do DNA depende do seu conteúdo de G-C, assim como da sua sequência e do seu tamanho (quanto maior for a molécula, maior será a sua estabilidade <sup>4</sup>). A estabilidade do DNA pode ser determinada de várias maneiras e uma delas é a temperatura de desnaturação do DNA. Por definição, a temperatura de melting é a temperatura na qual 50% das moléculas de DNA em solução se encontra na forma de dupla cadeia e os outros 50% na forma de cadeia simples<sup>13</sup>. O aumento da temperatura leva a uma quebra das ligações entre as bases e por consequente a quebra da estrutura de dupla hélice. O melting do DNA é característico da cadeia que se encontra em análise pois este depende da força iônica das ligações assim como do conteúdo em GC, sendo que, quanto maior for o conteúdo em GC maior será a temperatura de melting, pois será necessária mais energia para quebrar as ligações do que num tipo de DNA rico em AT <sup>14</sup>.

Em laboratório, experiências que envolvem melting de DNA são utilizadas para observar a estabilidade da molécula e possibilitam o estudo de interações da mesma com outras moléculas. A partir de uma experiência de melting de DNA com moléculas que interagem com o mesmo, é possível observar se as mesmas estabilizam ou destabilizam o DNA sendo essa evidência clarificada com a alteração da temperatura de melting do DNA. Na presença de moléculas ou metais, é possível ter uma percepção do tipo de interação que existe com DNA, sendo que estas



podem interagir através dos *grooves* ou por uma intercalação entre bases. Normalmente, uma interação com os *grooves* apresenta um aumento da temperatura de melting mas a intercalação expressa-se através de um aumento mais perentório<sup>15</sup>.

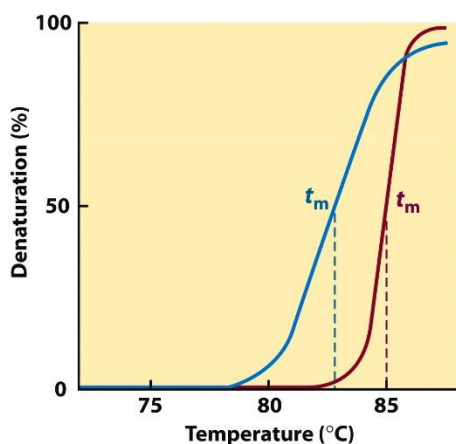


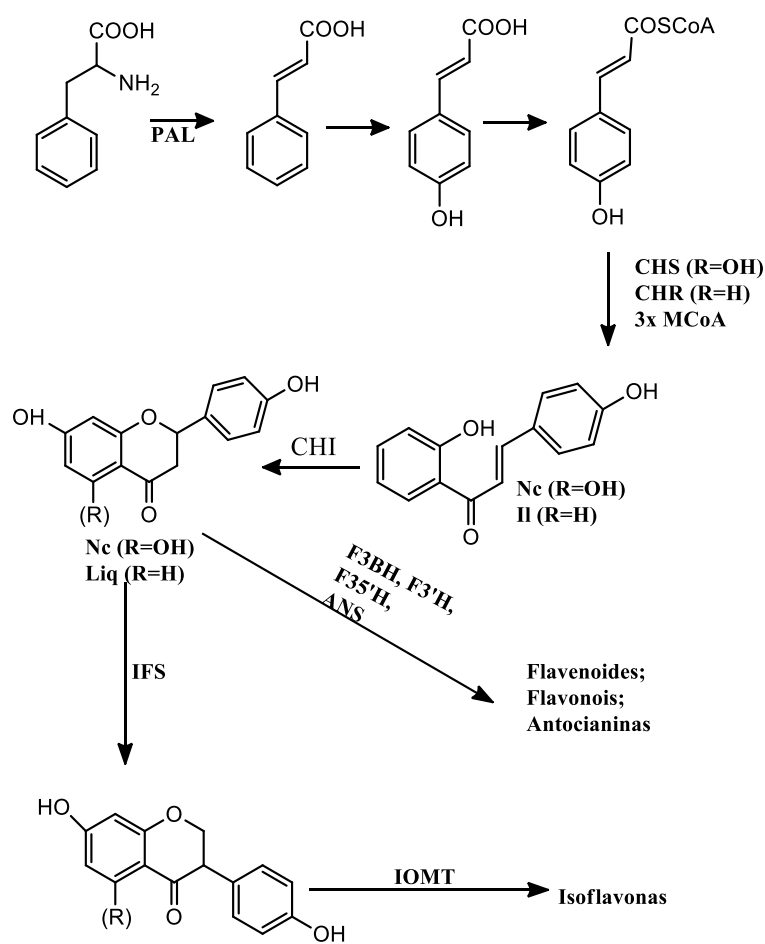
Figure 8-27a  
Lehninger Principles of Biochemistry, Fifth Edition  
© 2008 W. H. Freeman and Company

**Figura 10- Representação gráfica de uma experiência de melting. A azul está representado a des-naturação de uma molécula de DNA e a vermelho está a representação de uma cadeia com alto teor em G-C.<sup>14</sup>**

O estudo de compostos químicos que se encontram envolvidos em processos biológicos, aliado a propriedades fotoquímicas, tem suscitado interesse na comunidade científica. O desenvolvimento de sondas ou agentes terapêuticos capazes de interagir com o DNA tem tido como propósito a compreensão do mesmo, de modo a possibilitar o desenvolvimento a adaptação da interação destes com agentes terapêuticos, por exemplo<sup>4</sup>. Deste modo, o estudo de interação de flavonoides com DNA possibilita essa mesma compreensão.

## I.2- Flavonoídes

Um flavonoide consiste numa ampla classe de compostos com baixo peso molecular, sendo caracterizados como derivados polifenólicos<sup>16</sup>. Estes possuem uma estrutura de um anel de benzeno ligado a um grupo pirano, sendo sintetizados a partir da via fenilpropanoide (figura 11). Os flavonoides são classificados como ubíquos, estando presentes nas plantas tendo como característica atividade farmacológica e antioxidante. São substâncias fenólicas hidroxiladas e são conhecidas por serem sintetizadas por plantas em resposta a infeções microbianas.<sup>17</sup>



**Figura 11- Representação da via fenilpropanóide, adaptado<sup>18</sup>**

A sua atividade que é dependente da sua estrutura e, por seu lado, a sua natureza química, depende da sua classe estrutural, do seu grau de hidroxilação, conjugações, grau de polimerização e presença de outros constituintes<sup>16, 17</sup>. A sua função antioxidante deve-se à presença de grupos hidroxilo e o seu grau de hidroxilação irá definir a sua capacidade de eliminar radicais livres (capacidade de transferir elétrons para os radicais livres) ou a capacidade de quelação de iões metálicos, sendo que a quelação<sup>16, 17</sup> irá prevenir a formação de radicais livres capazes de danificar biomoléculas.

Flavonoides possuem a capacidade de induzir sistemas enzimáticos que protegem o organismo humano como resposta a vários tipos de infeções (bacterianas e virais), tal como o combate a doenças degenerativas como é o caso do cancro<sup>16</sup>.

### I.2.1 -Química dos flavonoides

Flavonoides são compostos que possuem como esqueleto 15 átomos de carbono organizados em dois anéis de benzeno A e B, ligados por anel heterocíclico pirano denominado por C como esta representado na figura 12<sup>16, 17</sup>.

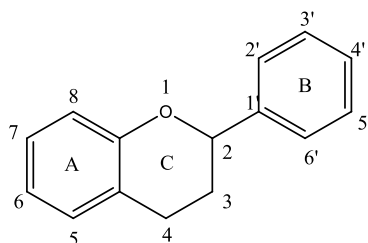


Figura 12- Estrutura base de um flavenóide <sup>16, 17</sup>

Os flavonoides possuem uma vasta variedade de classes, sendo que a sua distinção é feita tendo em conta o seu grau de oxidação e a via de substituição no anel C, enquanto que compostos dentro da mesma classe derivam na substituição nos anéis A e B<sup>16, 17</sup>.

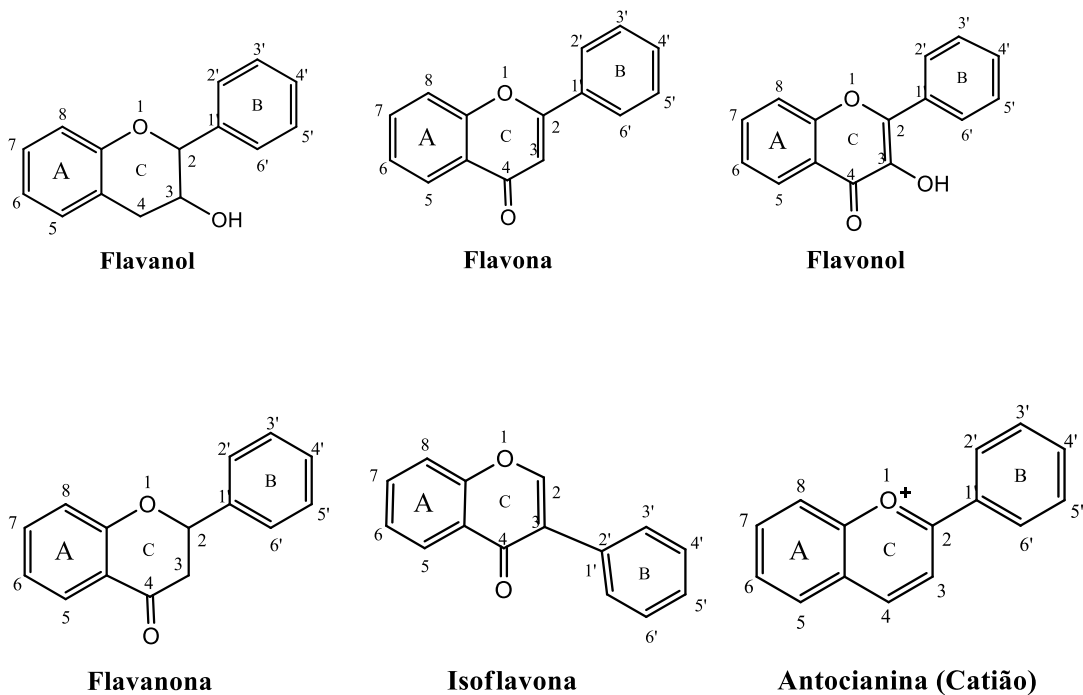


Figura 13- Classificação das classes de Flavonoides <sup>16, 17</sup>

### I.3- Antocianinas

As antocianinas são uma classe do grupo dos flavonoides (denominadas por bioflavonoides por alguns autores<sup>19</sup>) sendo que podem ser detetados em chás, vinhos, frutas, vegetais, cereais, mel, possuindo efeitos benéficos para a saúde humana.

Estas possuem propriedades antioxidantes e são muito utilizados como corantes na indústria alimentar devido a serem os pigmentos responsáveis pela cor vermelha e azul de frutos e flores na Natureza<sup>20, 21</sup>.

Através da ingestão de bioflavonoides, como é o caso das antocianinas, estudos sugerem que estes irão participar em mecanismo de ação que provocam efeitos benéficos no organismo humano. A ingestão de antocianinas isoladas ou em mistura com outros bioflavonoides<sup>19</sup>, sugere que estes poderão estar envolvidos em mecanismos de ação de extrema importância, como a proteção do DNA para que este não sofra clivagem, inibição enzimática, produção de citosina (molécula que regula as respostas imunológicas), peroxidação lipídica (degradação oxidativa de lípidos), diminuição da permeabilidade e fragilidade capilar, entres outros processos. Devido à sua preponderância na Natureza como os benefícios que traz a processos complexos do nosso organismo, torna-se essencial conhecer os bioflavonoides<sup>19</sup>.

#### I.3.1- A química e estabilidade das antocianinas

As antocianinas são compostos orgânicos que existem em abundância na Natureza. As classes de antocianinas, geralmente são associadas à sua forma de catião flavílio<sup>22</sup>, diferenciam-se na posição em que se encontram glicosidados, podendo o açúcar estar ligado na posição 3 do anel C, na posição 3 e 5 do anel B ou, com menor frequência, na posição 7 do anel A<sup>21</sup> (figura 14).

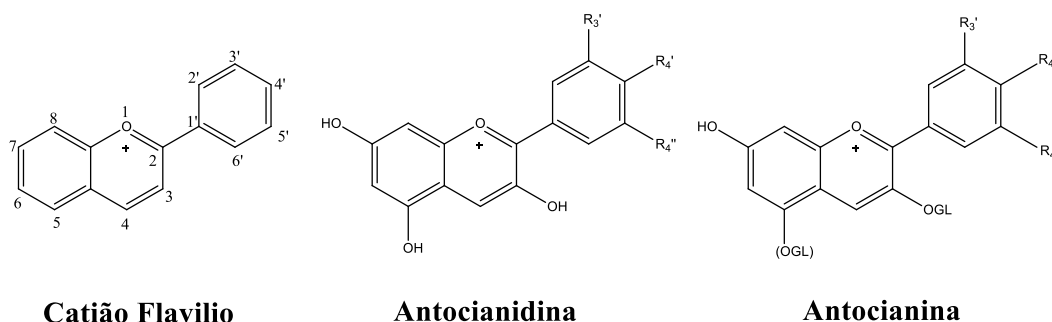


Figura 14- Compostos benzopirílicos derivados de antocianinas.<sup>21-23</sup>

Os sais de flavílios (antocianinas) podem ser classificados tendo em conta as substituições que ocorrem no anel B (posições  $R^{4''}$  e  $R^{3'}$ ). No anel B, as substituições que normalmente ocorrem, baseiam-se em substituições de grupos metóxilo e hidroxilo, levando à formação de 6 tipos de antocianinas, como se encontra descrito na tabela seguinte<sup>24</sup>.

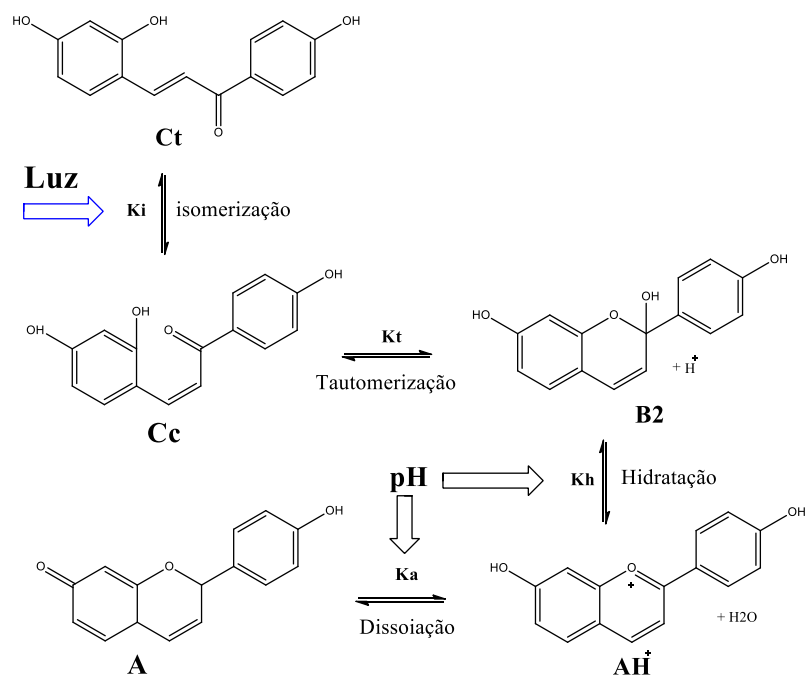
**Tabela 1- Representação das diferentes classes de antocianinas<sup>24</sup>**

<i>Antocianinas</i>	$R^{3'}$	$R^{4''}$
<i>Pelardonidina (PG3gl)</i>	H	H
<i>Cianidina (Cy3glc)</i>	OCH <sub>3</sub>	H
<i>Peonidina (Pn3glc)</i>	OH	H
<i>Delfinidina (Dp3glc)</i>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
<i>Petunidina (Pt3glc)</i>	OCH <sub>3</sub>	OH
<i>Malvidina (Mv3glc)</i>	OH	OH

As antocianinas, possuem características químicas que definem a sua cor e estabilidade. Estas características são alteradas quando existe exposição à luz (fotossensíveis), temperatura, pH, reações enzimáticas e degradação de radicais livres (ROS- associado à sua atividade antioxidante)<sup>24</sup>. Esta exposição altera a cor e a estabilidade do composto.

## I.4- Flavílios

Flavílios são compostos químicos pertencentes à classe das antocianinas que possuem uma rede complexa de equilíbrios, podendo ser detetadas 5 espécies: Base Quinoidal (A), Catião do Flavílio (AH<sup>+</sup>), Hemicetal (B<sub>2</sub>), *cis*-chalcona (Cc) e *trans*-chalcona (Ct).<sup>20, 21, 24, 25</sup> Na figura 15, encontram-se sumariados os equilíbrios químicos. Denotar que as espécies apresentadas são gerais, tendo cada flavílio equilíbrios que apenas ocorrem no seu sistema químico.



**Figura 15- Rede de reações químicas de um flavílio com base no equilíbrio de 4'-hidroxioflavílio.<sup>20, 21, 23, 26</sup>**

O esquema da figura 15 representa a alteração de estrutura, originando as diferentes espécies acima descritas. Em solução, a alteração da espécie predominante deve-se a perturbações no meio como, a variação do pH ou a presença de luz. As reações referidas estão relacionadas com a alteração de cor da solução. A espécie AH<sup>+</sup> possui como característica a coloração vermelha e por seu lado a espécie A é associada à coloração roxa/azul.<sup>23</sup>

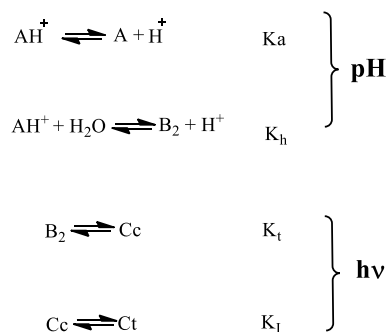
A pH ácido, a espécie predominante em solução é o catião Flavílico (AH<sup>+</sup>). Com o aumento do pH, a espécie AH<sup>+</sup> encontra-se envolvida em duas reações paralelas:

- 1- A desprotonação de AH<sup>+</sup> conduz à formação da espécie A (base quinoidal), numa reação descrita como dissociação- há a dissociação de um próton H<sup>+</sup>;
- 2- Formação do hemiacetal B<sub>2</sub> através de uma reação de hidratação na posição 2 com a perda de H<sup>+</sup>.

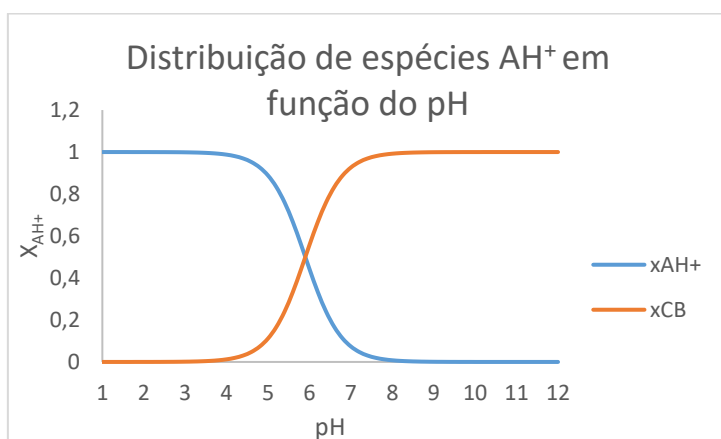
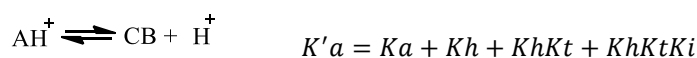
A transferência do próton é substancialmente mais rápida que a reação de hidratação, mas em muitos casos, a espécie A, em equilíbrio, é menos estável que as espécies B<sub>2</sub>, Cc e Ct. Deste modo, espécie A é formada como um produto cinético da reação e, ao longo do equilíbrio, irá sofrer uma diminuição da sua concentração relativa aquando a solução se encontra em equilíbrio. Através de uma reação de tautomerização, a espécie B<sub>2</sub> é convertida em Cc (*cis*-chalcona) sendo que esta espécie, poderá sofrer isomerização, levando à formação da sua forma isomérica (Ct- *trans*-chalcona).

### I.4.1 Rede química e propriedades dos Flavílios

Para uma melhor percepção da rede reacional de flavílios, representada no esquema da figura 15, pode-se descrevê-la através dos seguintes equilíbrios: <sup>20</sup>



De modo a simplificar os equilíbrios descritos do flavílios, podemos considerar estes como equilíbrios ácido-base. Assim, é possível simplificar a equação acima descrita do seguinte modo:



$$\begin{aligned}
 x_{\text{AH}^+} &= \frac{[\text{AH}^+]}{[\text{AH}^+] + [\text{CB}]} \\
 x_{\text{AH}^+} &= \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K'a} \\
 x_{\text{CB}} &= \frac{[\text{CB}]}{[\text{AH}^+] + [\text{CB}]} \\
 x_{\text{CB}} &= \frac{[\text{OH}^-]}{[\text{OH}^-] + k'_{\text{CB}}}
 \end{aligned}$$

**Figura 16- Distribuição de espécies teórica e equações associadas.**

O equilíbrio descrito na equação acima trata-se de uma representação do equilíbrio ácido-base existente em solução onde consideramos CB como base conjugada de AH<sup>+</sup>, onde CB representa as espécies A, B<sub>2</sub>, C<sub>c</sub> e C<sub>t</sub> juntas

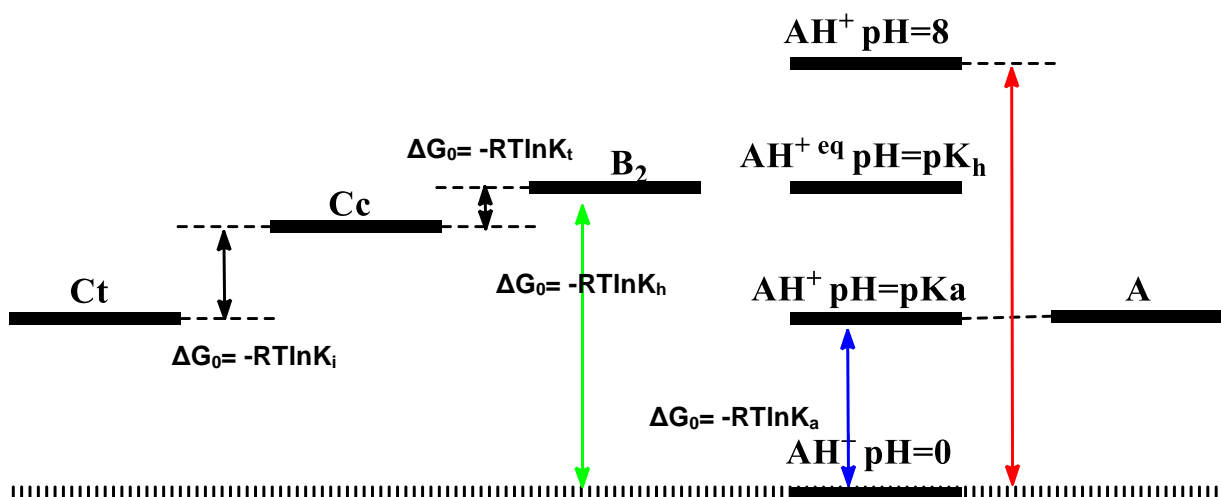


Figura 17- Termodinâmica de um sistema geral Flavílico.

No equilíbrio de ácido-base referido e com o auxílio da figura 17, a valores de pH mais baixos (ácido) a espécie predominante que se encontra e solução é a forma protonada ( $AH^+$ ). Com o aumento do pH a espécie  $AH^+$  é substituída pelas espécies que compõem a base conjugada CB.

No sistema descrito por CB, a espécie predominante em solução irá depender da natureza de substituição no anel benzopirílico, ou seja, o equilíbrio assim como as diferentes evoluções da reação irão representar diferentes rácios das espécies em solução.<sup>20</sup> Na maioria das antocianinas, a espécie B é o produto que existe em maior concentração relativa e, por seu lado, as espécies Ct e Cc terão um menor rácio em solução.

A figura 17 é representativa da estabilidade das diferentes espécies da rede química dos flavílios. A  $pH=0$  estamos perante a forma mais estável do flavílio, onde a energia do sistema é minimizada. Com o aumento do pH (seta azul), dá-se a formação da base quinoidal (A), estando esta em equilíbrio com a espécie protonada. Este equilíbrio é quebrado com o continuo aumento do pH (seta vermelha). Quando nos encontramos numa situação à qual o pH corresponde ao  $pK_h$ , pode existir uma reação de hidratação, na qual a espécie protonada é convertida num hemiacetal, estando o sistema em equilíbrio termodinâmico entre ambas as espécies (seta verde). Ao atingir-se o patamar acima de  $pK_h$ , o equilíbrio irá evoluir para o seu estado mais estável, ou seja, para a espécie que possui uma maior estabilidade a nível energético. Este fato é perceptível por análise à figura 16. Neste ponto, o sistema irá evoluir para o nível energético que lhe é mais favorável. Como referido anteriormente, irão existir diferentes rácios entre as espécies  $B_2$ , Ct e Cc.

No quadro reacional do flavílios, os substituintes que influenciam a posição 3 e 5, dão origem a formação a produtos de CB encontrando-se sob a forma de hemiacetal, sendo que este



tipo de substituição apresenta menores rácios para as espécies *cis* e *trans*. No caso de substituintes na posição 4 do anel, estes encontram-se geralmente num equilíbrio entre AH<sup>+</sup> e A.

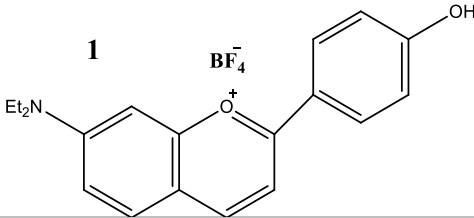
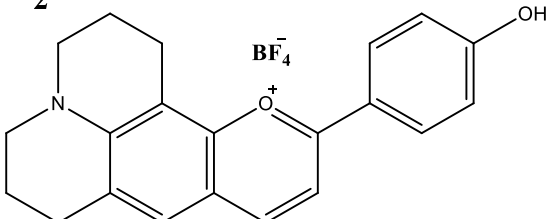
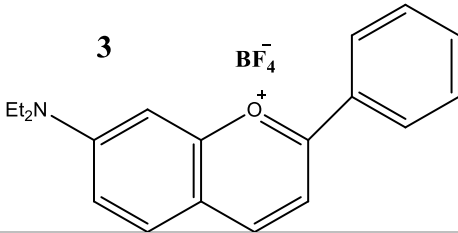
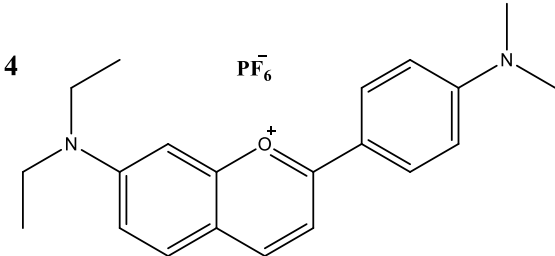
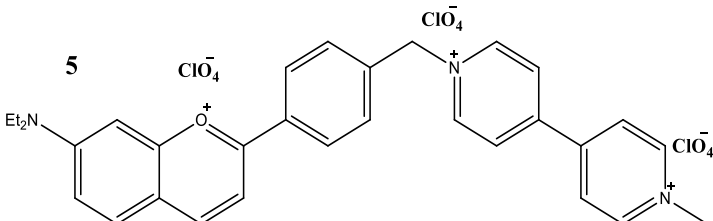
Neste tipo de redes químicas, a dependência do pH   elevada e tal possibilita a formação de espécies em *trans* em antocianinas mas são instáveis devido à presença do grupo hidroxilo na posição 3. A destabilização provocada pelo grupo hidroxilo, em solução, irá prorrogar uma decomposição de Ct em produtos irreversíveis.<sup>23</sup>

O estudo por técnicas espectroscópicas, como a espectroscopia de ultravioleta-visível, torna possível a detecção das diferentes espécies e solução tendo e conta o pH de trabalho assim como a interferência da luz. Assim sendo, por este tipo de técnicas e com o auxílio da literatura, torna-se importante a detecção das diferentes espécies.

O objetivo deste trabalho consiste no estudo da interação entre flavílios (II.1) e ácidos nucleicos (descritos em II.2) a pH=5 (região na qual os ácidos nucleicos não sofrem degradação e que o flavílio se encontra maioritariamente na sua forma de catão) de modo a perceber se existe interação entre ambos e, caso haja, que influência possui essa interação e se existe seletividade de bases por parte do flavílio, ou seja, se existe interações com maior ou menor afinidade consoante o tipo de DNA que é utilizado.

Começou-se por proceder a estudos de estabilidade dos flavílios e, após esses estudos, realizaram-se titulações dos 5 flavílios (tabela 2) com os 4 ácidos nucleicos recorrendo a técnicas espectroscópicas: ultravioleta-visível e fluorescência. Em paralelo foram realizadas medições dos tempos de vida dos 5 flavílios na presença/ausência de ácidos nucleicos (ctDNA e Poly (A: U)) e medida a estabilidade, por temperatura de *melting*, de dois tipos de ácidos nucleicos (poly (A: U) e ctDNA), na presença dos flavílios. Foram t mb m realizadas titulações, para o estudo de interação, de dois flavílios (III.3) com dois ácidos nucleicos (III.3) com recurso   técnica de RMN de modo a ter uma perceção das regiões do flavílio que, em solução com um tipo de ácido nucleico, eram mais afetadas. Utilizaram-se modelos matemáticos de modo a poder-se perceber melhor os dados obtidos pelas titulações realizadas com auxílio das técnicas de ultravioleta-visível e fluorescência. Todos os estudos de interação foram realizados a pH=5 de modo a não comprometer a integridade dos ácidos nucleicos visto ser um pH próximo de fisiológico e estarmos perante a forma AH<sup>+</sup> (espécie de interesse no estudo de interação).

Tabela 2- Favílios utilizados em estudo

Flavílio	Estrutura
1	
2	
3	
4	
5	

## II- Materiais e metodologias

---

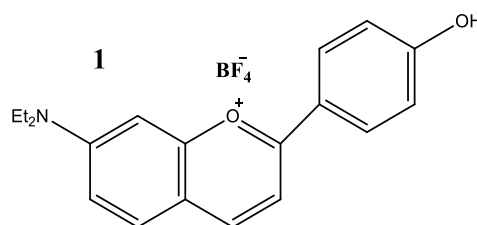
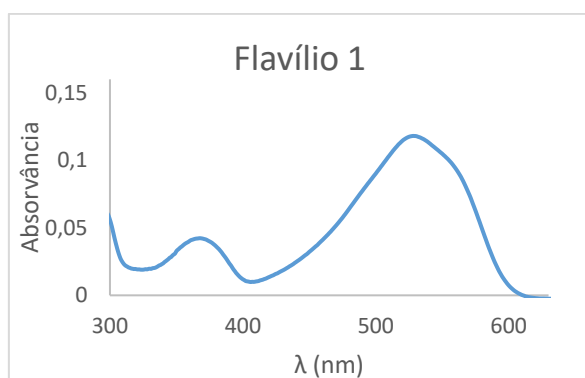
## II.1- Flavílios em estudo

Neste trabalho foram utilizados 5 tipos de flavílios para o estudo de interação com ácidos nucleicos. Os flavílios foram sintetizados, purificados e caracterizados no grupo de fotoquímica e Química supramolecular, utilizando o método de condensação, encontrando-se disponíveis, e podendo ser utilizados sem outros tratamentos adicionais.

Os flavílios enumerados de 1 a 5 foram estudados com o auxílio das técnicas de RMN, Espectroscopia de ultravioleta-visível, fluorescência e dicroísmo circular.

### Flavílio 1:

O flavílio 1, também denominado de 7-(*N,N*-dietilamino)-4'-hidroxiflavílio, possui como massa molecular 381,18 g/mol. Este possui uma substituição no carbono 7 (encontra-se ligado a um azoto que possui dois grupos etilo) e no carbono 4' (ligação a um grupo hidroxilo).



**Figura 18- Representação gráfica do espectro do Flavílio 1 (esquerda) e da estrutura do composto (direita).**

A figura 18 é representativa do espectro do flavílio 1 a pH=5. O composto em pó foi pesado e diluído em água e HCl 0,1 M, de modo a possuir pH 2, tendo como concentração  $1 \times 10^{-4}$  M. Posteriormente a solução foi diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diluído em água desionizada) para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo o pH final igual a 5 (pH de trabalho). A caracterização deste flavílio encontra-se descrita na literatura.<sup>27</sup>

### Flavílio 2:

O flavílio 2, 7-julol-4'-OH, tem como massa molecular 423,21 g/mol. Este possui uma substituição no carbono 6,7 e 8 (encontra-se ligado a um octahidro-1H-quinolizina) e no carbono 4' (ligação a um grupo hidroxilo). No início do trabalho este flavílio não se encontrava caracterizado, sendo posteriormente feita a sua publicação<sup>28</sup>.

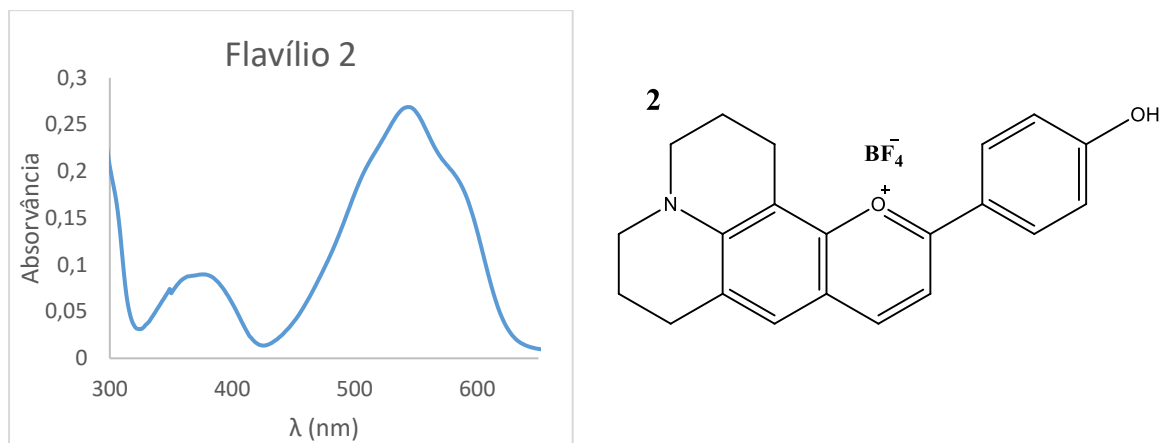
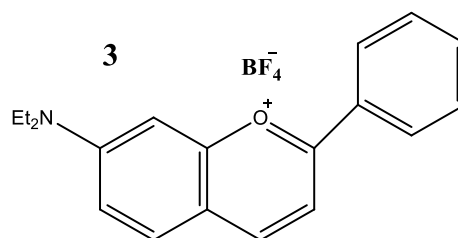
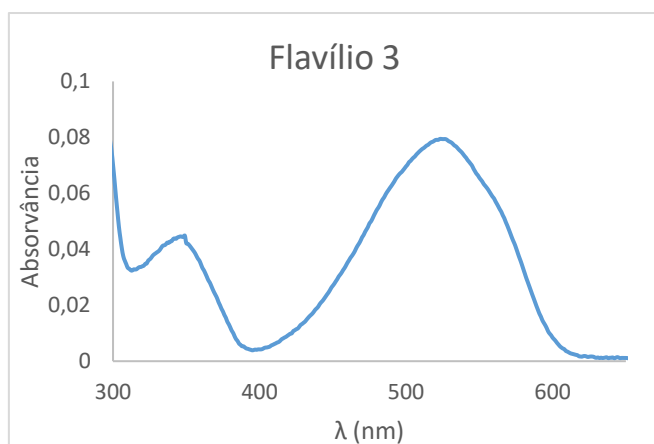


Figura 19- Representação gráfica do espectro do Flavílio 2 (esquerda) e da estrutura do composto (direita).

A figura 19 é representativa do espectro do flavílio 2 a pH=5. O composto em pó foi pesado e diluído em água e HCl 0,1 M, de modo a possuir pH 2, tendo como concentração  $1 \times 10^{-4}$  M. Posteriormente a solução foi diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diluído em água desionizada) para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo o pH final igual a 5 (pH de trabalho).

### Flavílio 3:

O flavílio 3, 7-(dietilamina)-2-(p-tolil)cromenilo, tem como massa molecular 292,39 g/mol. Este possui uma substituição no carbono 7 (encontra-se ligado a um azoto que possui dois grupos etil) e no carbono 4' (ligação a um grupo metilo). A caracterização deste flavílio não se encontra publicada. Este foi sintetizado por condensação de 4'-metilacetofenona com 4-(N,N-dietilamino)-2-idroxibenzaldeído.

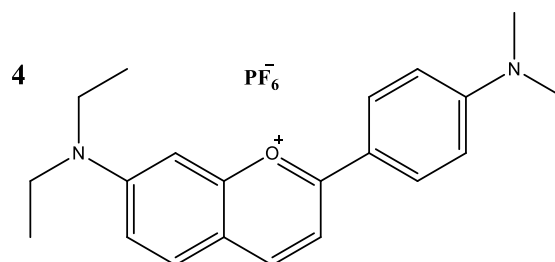
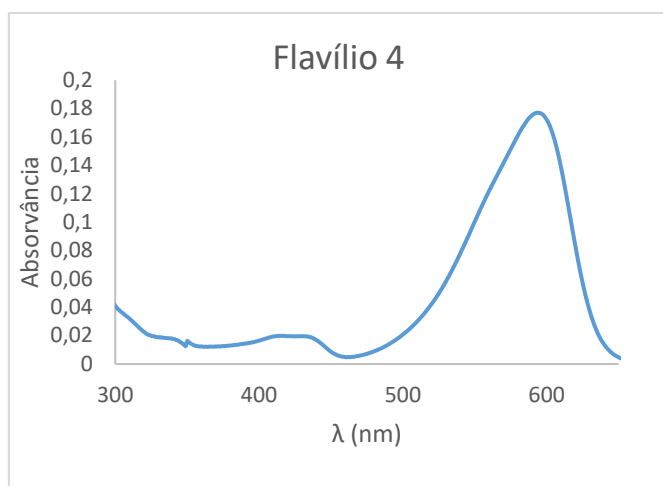


**Figura 20- Representação gráfica do espectro do Flavílio 3 (esquerda) e da estrutura do composto (direita).**

A figura 20 é representativa do espectro do flavílio 3 a pH=5. O composto em pó foi pesado e diluído em água e HCl 0,1 M, de modo a possuir pH 2, tendo como concentração  $1 \times 10^{-4}$  M. Posteriormente a solução foi diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diluído em água desionizada) para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo o pH final igual a 5 (pH de trabalho).

#### **Flavílio 4:**

O flavílio 4, 7-(dietilamina)-2-(4-(dietilamina)fenil)cromonolio, tem como massa molecular 321,44 g/mol. Este possui uma substituição no carbono 7 (encontra-se ligado a um azoto que possui dois grupos etil) e no carbono 4' (ligação a uma amina que possui dois grupos metil). A caracterização deste flavílio também não se encontra publicada na literatura, tendo sido realizada por condensação de 4'-(N,N-dietilamino)acetofenona com 4-(N,N-dimetilamino-2-hidroxibenzaldeído).

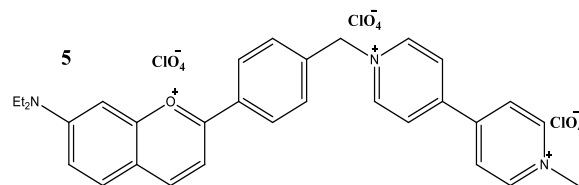
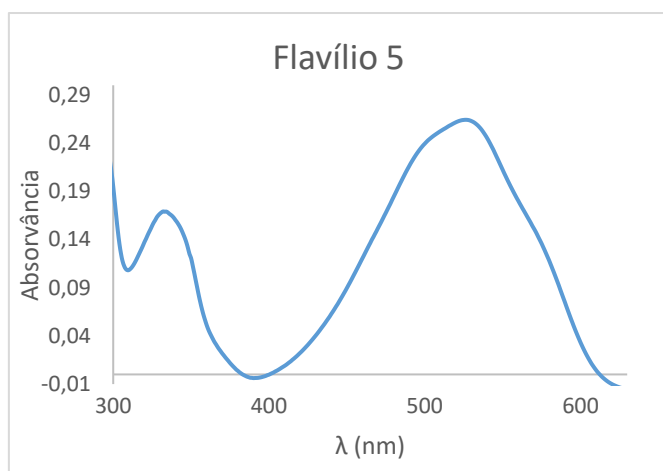


**Figura 21- Representação gráfica do espectro do Flavílio 4 (esquerda) e da estrutura do composto (direita).**

A figura 21 é representativa do espectro do flavílio 4 a pH=5. O composto em pó foi pesado e diluído em água e HCl 0,1 M, de modo a possuir pH 2, tendo como concentração  $1 \times 10^{-4}$  M. Posteriormente a solução foi diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diluído em água desionizada) para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo o pH final igual a 5 (pH de trabalho).

#### **Flavílio 5:**

O flavílio 5 (1-(4-(7-(dietilamina)cromenilo-2-il)benzil)-1'-metil-[4,4'-bipiridina]-1,1'-Dio) tem como massa molecular 462,60 g/mol. Este possui uma substituição no carbono 7 (encontra-se ligado a um azoto que possui dois grupos etil) e um substituinte na posição 4'. A caracterização deste flavílio encontra-se publicada<sup>29</sup>.



**Figura 22- Representação gráfica do espectro do Flavílio 5 (esquerda) e da estrutura do composto (direita).**

A figura 22 é representativa do espectro do flavílio 5 a pH=5. O composto em pó foi pesado e diluído em água e HCl 0,1 M, de modo a possuir pH 2, tendo como concentração  $1 \times 10^{-4}$  M. Posteriormente a solução foi diluída em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  diluído em água desionizada) para uma concentração de  $1 \times 10^{-5}$  M, sendo o pH final igual a 5 (pH de trabalho).

No presente trabalho, para facilitar a leitura, os flavílios serão denominados pelo seu número e vez de serem enunciados pelo nome de nomenclatura.



## II.2- Ácidos nucleicos

No estudo de interação de flavílios com ácidos nucleicos, foram utilizados 4 tipos de ácidos nucleicos que se encontram na tabela 3.

**Tabela 3- Tipos de oligos utilizados no trabalho.**

Nome	Sigla	Fabricante	Referência
<b>Ácido polideoxi- adnilico. ácido Politimidílico</b>	Poly (dA) • Poly (dT)	Sigma	P9764
<b>Ácido polioxigu- nanílico. ácido po- lideoxicitidílico</b>	Poly (dG) • Poly (dC)	Sigma	P3136
<b>Ácido poliade- nilico-poliuridílico</b>	Poly (dA) • Poly (dU)	Invivogen	Tlrl-pau
<b>“Calf thymus DNA”</b>	ctDNA	Sigma	D1501

O ácido nucleico Poly (A: T) é um homopolímero de dupla cadeia sintético, constituído por adeninas e timinas, semelhante ao DNA. A solução de stock foi separada em alíquotas e conservada a -20°C tendo uma concentração de 0,00121 M. As propriedades deste ácido nucleico permitem que a sua utilização seja direcionada para estudo de interação de moléculas com o DNA.

O Poly (G: C) é um homopolímero de dupla cadeia, sintético, com alto peso molecular, constituído por Guanina e Citosinas, análogo ao DNA. A dissolução destes polímeros não é fácil, sendo a solução de stock preparada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, sendo as alíquotas conservadas a -20°C, tendo uma concentração de 0,0027 M. Este ácido nucleico tem como principal aplicação os estudos dinâmicos do DNA aquando da presença de fármacos ou pequenas moléculas.

O Poly (A: U) é um ácido nucleico sintético análogo ao RNA, caracterizando-se por ser composto por apenas adeninas e uracilos. Este possui cadeia dupla e a solução stock é preparada de acordo com as instruções do fabricante- (às 10 mg de Poly (A: U) é necessário adicionar 10 mL de água estéril fornecida, passando posteriormente por um processo de agitação de 10 minutos a 50° e conservado a -20°C, a uma concentração de 0,0032 M.

O ctDNA é o DNA extraído do timo de vitela, estando preparado de acordo com as instruções do fabricante- em tampão fosfato Tris 10 mM pH 7.5-8.0 com 0,1 mM EDTA estéril, ficando com uma concentração de stock de 0,0029M, sendo que as alíquotas foram conservadas a -20°C.

Os ácidos nucleicos derivados do DNA apresentam a forma B-DNA, de modo a que os estudos sejam feitos em condições próximas das fisiológicas.

### II.3- Espectroscopia Ultravioleta-Visível e Fluorescência

O espectro eletromagnético engloba as radiações radio, infravermelho, cósmicas, raios-X, luz visível e ultravioleta. A radiação eletromagnética possui uma energia associada que pode ser descrita por:

$$E = h \times \nu$$

onde E é a energia, h é a constante de Planck ( $6,62 \times 10^{-34} \text{ Js}^{-1}$ ) e  $\nu$  é a frequência. (pag3)

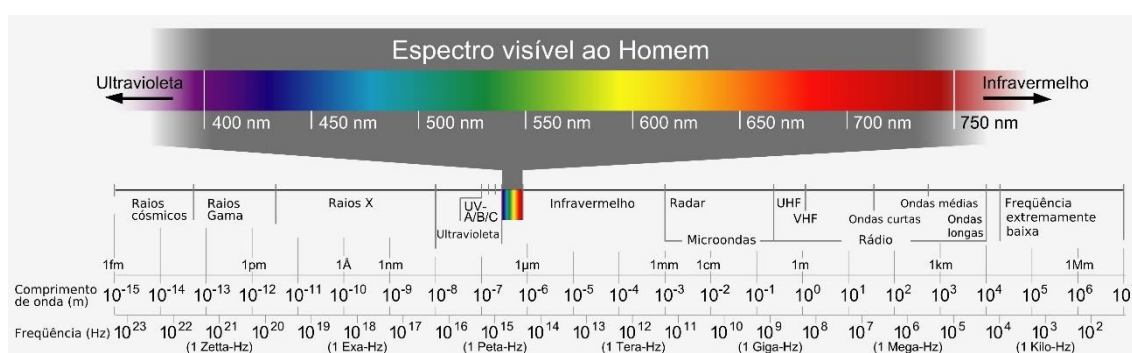


Figura 23- Espectro da radiação eletromagnética (ref)

A radiação eletromagnética possui duas vertentes na sua constituição. Esta apresenta uma combinação entre campo magnético e campo elétrico que possui um comportamento ondulatório<sup>30</sup>, como é perceptível na figura 24.

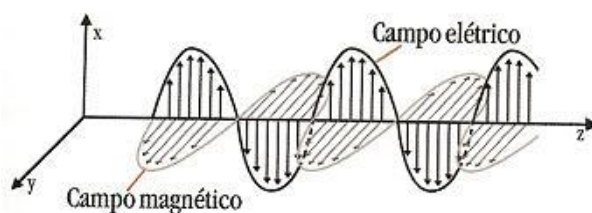


Figura 24- Representação do comportamento da luz. Associado ao campo elétrico está um campo magnético.

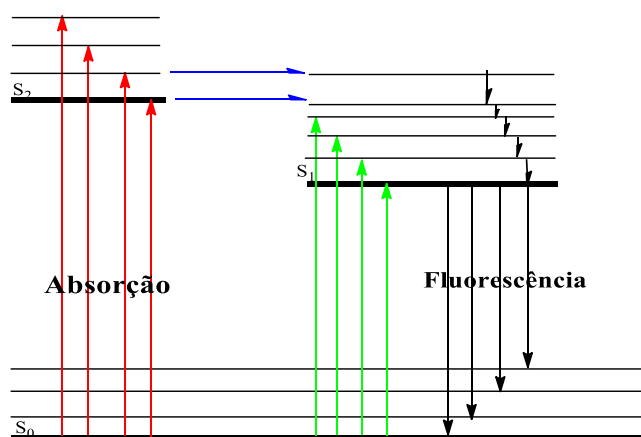
Como a luz possui comportamento ondulatório, esta pode ser classificada como comprimento de onda ou frequência:

$$\nu = \frac{c}{\lambda}, \text{ onde } \nu \text{ é a frequência, } c \text{ a velocidade da luz } (3 \times 10^8 \text{ ms}^{-1})^{30} \text{ e } \lambda \text{ é o comprimento de onda (expresso em nanómetros).}$$

A radiação ao interagir com a matéria pode desencadear vários processos, nos quais estão inseridos a absorção de energia, reflexão, dispersão, fluorescência, fosforescência e reações fotoquímicas. Ao interagir com a matéria, a radiação ao ser suficientemente energética, a energia do sistema de uma biomolécula irá aumentar. Esta energia não será continua sendo apenas um estado temporário. O tipo de radiação que interage com a matéria e a energia da mesma, irá definir que processo a nível atômico irá ocorrer na molécula. Deste modo o potencial de energia que é inculido no sistema será um somatório da energia eletrónica, vibracional e rotacional<sup>30</sup>.

$$E_{\text{total}} = E_{\text{eletrónica}} + E_{\text{vibracional}} + E_{\text{rotacional}}^{30}$$

Quando a luz interage com a matéria, esta ao ser suficientemente energética, irá desencadear um processo de excitação eletrónico onde o eletrão irá ocupar um estado de maior energia. Esta transição eletrónica deve-se à interação de fótons da radiação (neste caso na gama UV-Vis) com os eletrões da molécula originando uma transição entre estados energéticos. As transições que ocorrem apresentam como resultado bandas de absorção caraterísticas da transição.



**Figura 25- Transições eletrónicas após pulso de energia<sup>30</sup>. S<sub>0</sub> corresponde ao estado fundamental, S<sub>1</sub> e S<sub>2</sub> correspondem ao estado excitado.**

O esquema da figura anterior ilustra as transições eletrónicas que podem ocorrer no processo de absorção de luz. O eletrão numa primeira instância no estado fundamental, ou seja, no estado de menor energia S<sub>0</sub>. A luz ao interagir com o sistema, irá perturbar o mesmo ao transferir energia através da forma de um fóton. A energia transferida poderá ou não provocar

uma transição de estado energético, sendo que tal vai depender da energia da radiação. A energia transferida ao provocar uma transição energética irá alterar o estado do eletrão de  $S_0$  para  $S_2$  no caso de absorção da mesma. Nesta transição é possível visualizar o efeito de absorção por parte do sistema e com auxílio de instrumentação adequada obter espectros com informação sobre as biomoléculas. Na seção seguinte iremos abordar e expor o processo de fluorescência.

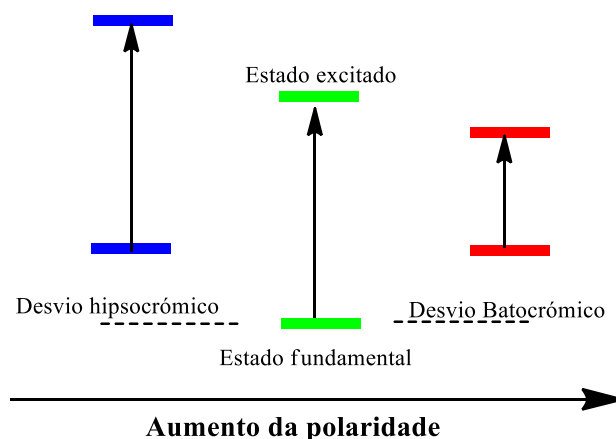
Uma característica importante de sistemas que absorvem a radiação visível em laboratório é a cor da solução<sup>31</sup>. A cor da solução encontra-se relacionada com a absortividade e a refletância (reflexão de luz por parte da amostra) da solução. Neste trabalho, os flavílios absorvem na região do visível e tal é expósito pela presença de cor nas soluções.



**Figura 26- Imagem ilustrativa das soluções preparadas. Da esquerda para a direita encontra-se de forma numérica crescente as soluções de flavílios utilizados (1 a 5).**

Outra característica que pode ser observada por emissão e por absorção é o desvio do máximo de comprimento de onda de um composto. Esta característica encontra-se associada às propriedades da molécula, sendo esta denominada de solvatocroísmo<sup>32</sup>.

Por definição, solvatocroísmo é o efeito observado da dependência de compostos orgânicos, nos espectros de absorção e emissão, em relação à polaridade do solvente<sup>32</sup>. Os desvios são denominados de batocrômicos (desvios para a região do vermelho) e hipsocrômicos (quando o desvio se dá para comprimento de onda de maior energia- azul) (figura 27).



**Figura 27- Influência do Solvente no desvio químico observado tanto por absorção como por emissão.**

Como enunciado, a polaridade do solvente afeta o ambiente químico dos compostos solvatocrômicos mas para além do efeito do solvente, também a interação deste tipo de compostos com outras moléculas poderá representar uma alteração da polaridade sentida pela molécula em estudo. Alterações do ambiente químico de um composto em solução com uma molécula também evidenciam alterações da polaridade em volta do composto, ou seja, no estudo das interações entre flavílios e ácidos nucleicos (IV.2) uma interação desencadeada entre as duas moléculas pode resultar na alteração do meio químico que rodeia o flavílio, alterando a polaridade do mesmo. As experiências realizadas por UV-Vis. foram feitas no espectrofotómetro *Carry 5000*.

A espectroscopia de UV-Vis, permite um vasto leque de experiências e análise quantitativa das soluções. Este tipo de análise é possível através do recurso à lei de Lambert Beer, que se encontra descrita na equação seguinte:

$A = \epsilon bc$  <sup>31</sup>, onde  $A$  é a absorvância medida na amostra;  $c$  é a concentração;  $b$  a área da célula e  $\epsilon$  representa o coeficiente de extinção molar.

Para além da análise quantitativa, esta espectroscopia permite a monitorização de soluções como atividades enzimáticas, reações, fusão, entre outras.

Como referido no capítulo anterior, a experiência de temperatura de *melting* baseia-se na separação das duas cadeias de DNA. O estudo de temperatura de *melting* com ácidos nucleicos deve ser seguido a 260 nanómetros devido à constituição das bases azotadas. Estas são compostas dos anéis aromáticos que absorvem na região do UV.

A partir desta técnica foram estudadas interações entre ácidos nucleicos e os flavílios em estudo através de titulações e com recurso à mesma foram feitos estudos de *melting* de soluções de ácidos nucleicos e de soluções de ácidos nucleicos e flavílios.

Utilizou-se a espectroscopia de absorção de UV-visível com o intuito de estudar possíveis interações, entre flavílios e ácidos nucleicos. Sendo o espectro de absorção característico da espécie ou da soma das espécies em solução, as alterações espectrais dos flavílios serão devido à presença dos ácidos nucleicos e tal poderá evidenciar uma interação.

## II.4- Fluorescência

Recorrendo ao capítulo II.3- Figura 25, após o processo de absorção, a molécula irá sofrer um aumento substancial de energia emergindo para um estado excitado, adquirindo nova conformação eletrônica. Após esta etapa, a molécula pode convergir para o estado fundamental através de diferentes processos. No capítulo anterior é descrito um desses processos.

Para além do decaimento apresentado anteriormente, a molécula pode voltar ao estado inicial através de processos não radiativos (decaimento da energia sem haver qualquer fenómeno associado) ou através de emissão. O processo de decaimento que se observa através da desativação do estado excitado proveniente entre estados com igual multiplicidade é denominado de fluorescência<sup>30</sup>. Por observação da figura 25 da secção II.3, é possível perceber os processos que ocorrem.

Após a absorção de energia podem ocorrer diferentes processos devido ao estado vibracional das moléculas. Os eletrões ao absorverem radiação encontrarem-se no estado excitado podendo estar em diversos níveis vibracionais, encontrando-se tanto em  $S_1$  como em  $S_2$ . Alguns picosegundos após o processo de absorção de energia, 10-12 picosegundos, a molécula tende a convergir para o estado vibracional de menor energia através de um processo denominado de relaxação vibracional, mantendo-se no estado excitado. A emissão de fluorescência baseia-se na alteração de estados eletrónicos ou no decaimento de eletrões do estado  $S_1$  para  $S_2$ . Estes após alguns picosegundos irão convergir para o estado fundamental observando o fenómeno de fluorescência.

Para além deste fenómeno, se a energia absorvida pelas moléculas for suficiente para que os eletrões adquiram um estado excitado que não é suficiente para atingir o estado  $S_2$ , mas seja suficiente para atingir  $S_1$ , o decaimento dos eletrões irá desencadear o processo de emissão de fluorescência. Em suma, após absorção de luz algumas moléculas sofrem decaimento para o estado fundamental emitindo luz, esta informação pode ser observada no espectro de fluorescência e, da mesma forma que as interações entre as moléculas presentes na solução, podem traduzir-se em alterações do espectro de absorção, o espectro de fluorescência pode igualmente traduzir estas interações, que podem ser observadas por alterações nas bandas de emissão, desvios ou na intensidade de fluorescência do flavílio.

Neste trabalho a técnica de espectroscopia de fluorescência é utilizada para a monitorização das titulações entre flavílios e ácidos nucleicos e estudo de estabilidade dos flavílios. Todos os flavílios foram excitados a 530 nm. O trabalho foi desenvolvido no espectrofotómetro *Jobin Yvon Horiba SPEX3 IHR320*.

## II.5- Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

A técnica de Ressonância Magnética nuclear (RMN), apresenta como principais vantagens o facto de não ser uma técnica destrutiva (que é favorável quando a síntese de compostos que é dispendiosa em termos económicos e em horas laborais). Em particular, o RMN é a técnica que maior semelhança permite atribuir ao sistema em estudo comparativamente às condições fisiológicas nas quais se encontram a proteína e o ligando, nomeadamente através do RMN em solução ou RMN in vivo. Finalmente a versatilidade da técnica fica também patente na capacidade que permite ao utilizador estudar sistemas de elevada afinidade entre o recetor e o ligando (estudos do ponto de vista da proteína) ou de média-baixa afinidade (estudos na ótica do ligando).

Conceptualmente, foram postuladas duas aproximações com o objetivo de estudar processos de reconhecimento molecular entre recetores biológicos e pequenas moléculas (ligandos), sendo que estas podem ser efetuadas i) sobre o ponto de vista do recetor molecular ii) do ponto de vista do ligando.

No que diz respeito aos estudos que pretendem elucidar quais as regiões do receptor que se encontram a interagir com o ligando, o parâmetro que usualmente é utilizado é o do desvio químico.

O desvio químico apresentado por um núcleo é sensível ao ambiente químico envolvente, nomeadamente este irá ser o resultado do campo magnético aplicado, bem como dos pequenos campos magnéticos inferidos por parte do ligando. Assim, quando na presença do ligando, os núcleos presentes no local de ligação irão sofrer um efeito de blindagem ou desblindagem inerentes à aproximação do primeiro ao recetor.

No que diz respeito ao estudo da interação proteína-ligando do ponto de vista do ligando, esta pode ser efetuada essencialmente segundo duas abordagens. Numa primeira abordagem e em consonância com o que foi dito anteriormente, a interação pode ser estudada através da monitorização dos diferentes parâmetros do RMN tais como: desvio químico, relaxação longitudinal T1, relaxação transversal T2 (através da largura de linha) e difusão. Recentemente e na base do efeito de NOE (Nuclear Overhauser Effect- efeito de transferência nuclear de spin) surgiram novas abordagens baseadas na observação das alterações dos movimentos rotacionais do ligando após reconhecimento por parte da proteína tais como o STD-RMN e o trNOE.<sup>33</sup> No entanto, estas técnicas de RMN, não estão apenas limitadas a proteínas, mas também a estudos que envolvam DNA.<sup>34</sup>

A principal característica utilizada no que diz respeito ao estudo de interações do ponto de vista do ligando prende-se com as diferentes taxas de rotação molecular em solução evidenciadas entre a proteína ou DNA (alto peso molecular) e o ligando (baixo peso molecular).

Relativamente a T2 (largura de linha a meia altura) de uma ressonância espectral de um ligando é bastante mais estreita que a largura de linha de uma estrutura macromolecular como é o caso da proteína ou DNA. Após o reconhecimento do ligando por parte da proteína ou DNA, este irá adotar as características do segundo evidenciando proporcionalmente um aumento da largura de linha. Por outro lado, efeitos de T2 estão envolvidos na modelação da relaxação longitudinal T1, assim a relaxação T1 de moléculas pequenas é também ela influenciada pela sua ligação a recetor macromoleculares.

Neste trabalho, os ensaios foram realizados, através do espectro 1D  $^1\text{H}$  RMN, de acordo com diferentes concentrações de ácido nucleico de modo a monitorizar as diferenças de intensidade do flavílio, ou seja, a concentração do flavílio é constante ao longo da titulação, sendo a variável a concentração de ácido nucleico.

Os rácios dos picos de intensidade obtidos ( $I_{\text{obs}}/I_0$ )<sup>35</sup>, na presença ( $I_{\text{obs}}$ ) e ausência ( $I_0$ ) de ácido nucleico estão relacionados com a fração que se encontra ligada, ou seja, o aumento da largura da linha está relacionado com a diminuição do rácio das intensidades demonstrando os prótons do flavílio que são responsáveis pela interação com a macromolécula.

Os estudos realizados através da espectroscopia de RMN tiveram como parceria o grupo *(Bio)Molecular Structure and Interaction by NMR*.

## II.6- Tempos de vida

A técnica de medição de tempos de vida é uma técnica baseada na espectroscopia de fluorescência resolvida no tempo. Esta técnica permite o estudo, a nível molecular, dos acontecimentos que ocorrem no tempo de vida do estado excitado no composto em estudo.

A técnica de fluorescência resolvida no tempo consiste no registo temporal entre o pulso de luz de excitação e o primeiro fóton emitido que é detetado num fotomultiplicador. Através da repetição múltipla do processo, este permite a construção e análise de histograma do decaimento de fótons.

Nesta técnica, a amostra em estudo sofre um pulso de luz estreito que ao interagir com a matéria, irá provocar a emissão de fótons. Após a obtenção dos decaimentos, procede-se a uma análise dos resultados através do recurso de regressões não lineares. Assim, a amostra irá sofrer um de dois processos de análise:

- 1) Nos casos mais simples, o decaimento pode ser analisado através do uso de mono-exponenciais. Este tipo de análise é feito para modelos mais simples, onde o decaimento é ajustado a uma mono-exponencial:



$$i(t) = A + B \exp(-i / \tau)$$

onde:  $\left\{ \begin{array}{l} i(t) \text{ é a intensidade da função tempo;} \\ i \text{ é o ponto experimental;} \\ \tau \text{ representa o tempo de vida de flourescência} \end{array} \right.$

- 2) Em casos mais complexos, recorre-se à uma aproximação de um bi-exponencial. Nestes sistemas mais complexos, o decaimento observado é ajustado a um sistema de duas exponenciais.

$$i(t) = A + B_1 \exp(-i / \tau_1) + B_2 \exp(-i / \tau_2)$$

A utilização de uma bi-exponencial adequa-se na presença de sistemas mais complexos com mais do que um processo ou uma espécie no estado excitado. Neste caso,  $\tau_1$  representa o tempo de vida de fluoreescência analisado através de uma exponencial e  $\tau_2$  refere-se à análise do tempo de vida de duas exponenciais.

Na análise dos tempos de vida, teremos que ter em conta qual o melhor recurso, que se deve recorrer, num processo de análise. Para tal, é considerado um bom ajuste aquele em que possua um valor de  $\chi^2$  residual próximo da unidade sendo também fundamental, para o ajuste uma distribuição uniforme de resíduos.

## II.7- Dicroísmo circular

A espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD) é uma técnica usada extensivamente para o estudo de moléculas quirais, de vários tipos e tamanhos, sendo que a sua maior aplicação é em estudos com macromoléculas biológicas<sup>36</sup>.

A utilização de CD permite uma análise da estrutura secundária/conformação das macromoléculas, principalmente em estudos que envolvem a estabilidade das mesmas tendo em conta o ambiente que as rodeia, temperatura ou pH<sup>36</sup>. Os estudos de estabilidade com proteínas, por exemplo, permitem detetar alterações a nível da estrutura secundária ou interações com outras moléculas. A partir da técnica de CD é obtida informação estrutural, cinética e termodinâmica de macromoléculas em solução.

As experiências de CD são realizadas na região do UV-Vis., sendo monitorizadas as transições eletrónicas. Caso a molécula em estudo contenha um cromóforo quiral, o sinal de CD reproduzido será diferente de zero. O sinal gerado pelo dicroísmo circular pode ser positivo ou

negativo quando existe interação entre moléculas<sup>36</sup>. A observação de um sinal ICD nas bandas de absorção de um ligando quiral é indicativo de uma interação entre flavílios e o ácido nucleico.

Inúmeros ligandos de DNA são aquirais, como é o caso dos flavílios, ou seja, são opticamente inativas. Quando em solução, os ligandos interagem com o DNA, estes adquirem um sinal induzido de CD (ICD)<sup>37</sup> gerado através do acoplamento das transições eletrônicas produzidas entre o ligando (flavílio) e as bases do ácido nucleico. O sinal adquirido por CD na interação é visível na gama de comprimentos de onda o flavílio possui um máximo de absorvância.

Os resultados obtidos de CD foram obtidos através de uma parceria com o laboratório *Biomolecular interactions and spectroscopy*, Zagreb.

## II.8- Constantes de associação.

O estudo de processos macromoleculares através de espectroscopia UV-Vis (por exemplo), permite proceder a estudos cinéticos com o intuito da obtenção de constantes de associação (K). Estas, permitem-nos ter uma perceção matemática de vários processos biológicos, como por exemplo, a obtenção de velocidades de reação entre enzimas.

De modo a obter constantes de associação por espectroscopia de UV-Vis., é necessário (aos resultados obtidos), tratar e ajustar os valores de absorvância de modo a serem processados. Existem inúmeros modelos matemáticos na literatura dedicados ao estudo de obtenção de constantes de associação variando em termos da sua complexidade.

Utilização de modelos matemáticos em sistemas reacionais complexos, como é o caso dos flavílios, é um processo complexo e bastante sensível a erros não sendo fácil a realização do ajusto dos modelos matemáticos neste tipo de sistemas.

Como enunciado anteriormente, existem inúmeros modelos matemáticos capazes de obter constantes de associação sendo que, neste trabalho foram utilizados os modelos de Langmuir<sup>38</sup> e Scatchard<sup>38</sup> e de McGhee - von Hippel<sup>39, 40</sup>.

- 1) O modelo de isotérmica de Langmuir consiste num modelo simples que descreve a partição entre a fase gasosa e uma superfície com um dado número de sítios de ligação (interação), em função da pressão aplicada, sendo expresso pelo número de moléculas adsorvidas relativamente ao número total de locais disponíveis para adsorção (neste caso o modelo é adaptado para o número de moléculas que podem interagir, flavílio, com o número de locais disponíveis para a interação (concentração de ácido nucleico em pares de bases).

$$\frac{X_0 - X}{X_0 - X_{\text{sat}}} = \frac{c}{c + \frac{1}{K}}$$

1

A equação 1 representa o ajuste de Langmuir adaptado para o caso em estudo, onde  $X_0$  representa absorção do flavílio,  $X_{sat}$  representa o valor máximo de absorvância (final da titulação),  $X$  a absorvância num ponto em estudo,  $c$  a concentração de ácido nucleico e  $K$  a constantes de associação.

- 2) O modelo de Scatchard é um modelo cujo ajuste matemático é bastante complexo e pouco sensível. Muitos autores de artigos sobre o estudo de interação de ácidos nucleicos com outras moléculas, recorrem a este ajuste matemática sendo que, na maioria dos casos, estes não possuem resultados totalmente conclusivos devido à sensibilidade ao erro a que o modelo está sujeito.

$$\frac{[M]_{total}}{f} = \frac{1}{N \times K f \times (1 - f)} + \frac{[L]_{total}}{N} \quad 2$$

A equação 2 representa o ajuste de Scatchard adaptado para o caso em estudo, onde:

- $[M]_{total} / f$  representa a fração de flavílio que interage com o ácido nucleico;
- $[L]_{total} / N$  representa o número de locais de ligação totais disponíveis para interação;
- $K_f$  é a constante de associação
- $(1-f)$  representa a concentração de ligando livre;
- $N$  representa os locais de ligação.

- 3) O ajuste matemático realizado com o modelo de McGhee - von Hippel possibilita uma análise quantitativa da interação entre proteínas e ácidos nucleicos para modelos cooperativos e não cooperativos. Quando nos encontramos num sistema não cooperativo ( $n=1$ ) o modelo (que é uma derivação do modelo de Scatchard) aproxima-se do representado no ponto 2 mas em sistemas mais complexos (como é o caso do estudo da interação de flavílios com os ácidos nucleicos) este possui uma melhor ajuste tendo em conta um sistema que envolve dois complexos.

$$\frac{r}{cf} = K'(1 - nr) \left[ \frac{1 - nr}{1 - (n-1)r} \right]^{(n-1)} \quad 40$$

Onde:  $K'$  representa a constante de ligação entre o flavílio e o ácido nucleico;

$R$  é o número de moles de flavílio ligadas por molécula de ácido nucleico;

$C_f$  representa a concentração molar de flavílio livre;  $n$  é o parâmetro de exclusão.

Foram também obtidos os valores de constante de ligação para os 5 flavílios através dos resultados de dicroísmo circular pelo laboratório *Biomolecular interactions and spectroscopy*, onde é feito um ajuste baseado nos modelos anteriormente descritos.

### III-Procedimento experimental

---

### **III.1-Estudo de estabilidade dos flavílios**

Primariamente procedeu-se ao estudo de estabilização dos flavílios, na ausência de ácidos nucleicos, sendo este estudo realizado a pH=5 e a uma temperatura de 20°C. As soluções de flavílio foram preparadas com tampão fosfato tendo uma concentração de  $10^{-5}$  M. As soluções foram preparadas de fresco sendo que foram obtidos os espectros de absorvância e de fluorescência de modo a caracterizar a estabilização do composto ao longo do tempo. No estudo da estabilização também se procedeu à caracterização do flavílio 2 visto que na altura não se encontrava nada na literatura acerca deste flavílio.

Foram preparadas 16 soluções a diferentes pHs (2,41; 3,77; 4,45; 5,53; 6,61; 7,16; 7,85; 8,25; 8,49; 8,76; 9,09; 9,57; 9,93; 10,33 10,52; 11,04) utilizando tampão universal (tampão constituído por vários sais com grande força iónica- constituição em anexo), HCl 0,01 M e NaOH 0,01 M para acerto do pH (crison pH- Meter Basic 20+). Após a preparação das soluções a diferentes pHs, o flavílio foi colocado numa célula de 3 mL, sendo que foram pipetados os volumes de 1 mL de flavílio com 1 mL de tampão universal e 1 mL de NaOH 0,01 M para todas as soluções exceto a de pH 2,41, sendo o 1 mL de NaOH substituído por nova adição de 1 mL de tampão.

### **III.2- Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos**

Após conhecido o tempo de estabilização do salto de pH de 2 para 5 (pH o flavílio se encontra maioritariamente na forma  $AH^+$ ) dos flavílios, procedeu-se a uma pequena titulação com poly (A: U) e ctDNA-  $2 \times 10^{-5}$  (6,25  $\mu$ L; 6,75  $\mu$ L);  $1,5 \times 10^{-4}$  (46,9  $\mu$ L; 50,70  $\mu$ L) e  $1,8 \times 10^{-4}$  (56,25  $\mu$ L; 60,80  $\mu$ L)(3 células de 1 mL com 600  $\mu$ L de solução de flavílio pH=5 com uma concentração de ácido nucleico definida em cada célula)- de modo a definir-se o tempo de espera entre a adição e a aquisição dos espectros de absorção e fluorescência.

As titulações foram realizadas a pH=5 e com os flavílios a possuírem uma concentração de  $10^{-5}$  M. Estas tiveram como base a manutenção da concentração de flavílio e na variação da concentração de oligonucleótido. As soluções foram preparadas de fresco a pH=2, sendo posteriormente diluídas (1:10) em tampão fosfato. Foram seleccionadas diferentes concentrações de ácido nucleico para titular a solução de flavílio sendo que, a cada adição se procedeu a um processo de espera de 3 minutos (tempo médio para estabilização da interação) e, após cada adição, foram medidos os espectros de absorvância e fluorescência das amostras. As tabelas seguintes apresentam os valores de adição de oligonucleótidos durante as titulações.

**Tabela 4- Valores de adição de Poly (A: U) para os cinco flavílios**

<b>Concentração de Poly (A: U) (M)</b>	<b>Volume adicionado (<math>\mu</math>L)</b>
$1,0 \times 10^{-6}$	0,31
$5,0 \times 10^{-6}$	1,25
$1,0 \times 10^{-5}$	1,56
$2,0 \times 10^{-5}$	3,13
$4,0 \times 10^{-5}$	6,25
$8,0 \times 10^{-5}$	12,5
$1,2 \times 10^{-4}$	12,5
$1,5 \times 10^{-4}$	9,37
$1,8 \times 10^{-4}$	9,38
$2,0 \times 10^{-4}$	6,25
$2,2 \times 10^{-4}$	6,25
$2,5 \times 10^{-4}$	9,37
$3,0 \times 10^{-4}$	15,63

**Tabela 5- Concentrações e volumes a adicionar de ctDNA nas titulações com os 5 flavílios.**

<b>Concentração de ctDNA (M)</b>	<b>Volume adicionado (<math>\mu</math>L)</b>
$1,0 \times 10^{-6}$	0,34
$5,0 \times 10^{-6}$	1,38
$1,0 \times 10^{-5}$	1,72
$2,0 \times 10^{-5}$	3,45
$4,0 \times 10^{-5}$	6,90
$8,0 \times 10^{-5}$	13,79
$1,2 \times 10^{-4}$	13,79
$1,5 \times 10^{-4}$	10,34
$1,8 \times 10^{-4}$	10,34
$2,0 \times 10^{-4}$	6,90
$2,2 \times 10^{-4}$	6,90
$2,5 \times 10^{-4}$	10,34
$3,0 \times 10^{-4}$	17,24

**Tabela 6- Concentrações e volumes a adicionar de Poly dA.dT nas titulações com os 5 flavílios;\* - representa o ponto final da titulação com o flavílio 2;\*\*- refere-se ao ponto final da titulação para o flavílio 3,4 e 5 ;\*\*\*- refere-se ao final da titulação com o flavílio 1.**

<b>Concentração de Poly (A: T) (M)</b>	<b>Volume adicionado (µL)</b>
<b><math>1,0 \times 10^{-6}</math></b>	0,83
<b><math>5,0 \times 10^{-6}</math></b>	3,31
<b><math>1,0 \times 10^{-5}</math></b>	4,13
<b><math>2,0 \times 10^{-5}</math></b>	16,53
<b><math>4,0 \times 10^{-5}</math></b>	33,06
<b><math>8,0 \times 10^{-5}</math></b>	33,06
<b><math>1,2 \times 10^{-4}</math></b>	24,79
<b><math>1,5 \times 10^{-4}</math></b>	24,79
<b><math>1,8 \times 10^{-4*}</math></b>	16,53
<b><math>2,0 \times 10^{-4**}</math></b>	16,53
<b><math>2,2 \times 10^{-4***}</math></b>	24,79
<b><math>2,5 \times 10^{-4***}</math></b>	41,32

**Tabela 7- Concentrações e volumes a adicionar de Poly (G: C) nas titulações com os 5 flavílios.\* final da titulação do flavílio 5.**

<b>Concentração de Poly (G: C) (M)</b>	<b>Volume adicionado (µL)</b>
<b><math>1,0 \times 10^{-6}</math></b>	0,37
<b><math>5,0 \times 10^{-6}</math></b>	1,48
<b><math>1,0 \times 10^{-5}</math></b>	1,85
<b><math>2,0 \times 10^{-5}</math></b>	3,70
<b><math>4,0 \times 10^{-5}</math></b>	7,41
<b><math>8,0 \times 10^{-5}</math></b>	14,81
<b><math>1,2 \times 10^{-4}</math></b>	14,81
<b><math>1,5 \times 10^{-4}</math></b>	11,11
<b><math>1,8 \times 10^{-4}</math></b>	11,11
<b><math>2,0 \times 10^{-4*}</math></b>	7,41
<b><math>2,2 \times 10^{-4}</math></b>	7,41

### **III.3- Estudo de interação por RMN**

O estudo de interação de flavílios com ácidos nucleicos, através da técnica de ressonância magnética nuclear, tem como objetivo localizar as zonas do flavílio que interagem com o



ácido nucleico. A experiência consistiu na titulação do flavílio 1 com diferentes concentrações de ctDNA e Poly (A: U) e a obtenção dos espectros de próton ( $H^+$ ) ao longo da titulação- MHz *Bruker Avance III* equipado com uma sonda criogénica (CP-TCI), operando a uma frequência de 600,13 MHz sendo todos os resultados processados através do software *Bruker*.

Partiu-se de duas soluções, uma de flavílio (100  $\mu M$ ) com TSP (ácido trimetilsililprap-nóico) (40  $\mu M$ ) em tampão  $NaH_2 PO_4.H_2O$  (100 mM) a pH=5 a 298 K) -solução 1 e uma outra solução na proporção 1:2 de flavílio (100  $\mu M$ ) com ácido nucleico (200  $\mu M$ ) com TSP (40  $\mu M$ ) em tampão  $NaH_2 PO_4.H_2O$  (100 mM) a pH=5 a 298 K) - solução 2, onde foi obtido o espectro de  $H^+$  de cada uma e posteriormente procedeu-se à titulação da solução 2 para a 1. As adições feitas encontram-se nas tabelas seguintes. Os espectros de próton foram adquiridos com recurso ao Espetrómetro de RMN- 600 Mhz

**Tabela 8- Titulação fo Flavílio 1 com ctDNA**

<b>Propor- ção</b>	<b>[ctDNA] (<math>\mu M</math>)</b>	<b>Vt (<math>\mu L</math>)</b>	<b>Vadd (<math>\mu L</math>)</b>
1- 0,025	2,5	500	6,33
1- 0,075	7,5	506,33	12,98
1- 0,1	10	519,31	6,57
1- 0,25	25	525,89	42,64
1-0,5	50	568,52	81,22
1-1.	100	649,74	216,58

**Tabela 9- Titulação com Poly (A: U) para o flavílio 1 e 2**

<b>Proporção</b>	<b>[Poly (A: U)] (<math>\mu M</math>)</b>	<b>Vt (<math>\mu L</math>)</b>	<b>Vadd (<math>\mu L</math>)</b>
1- 0,001	1	500	2,51
1- 0,025	2,5	502,51	6,36
1-0,05	5	508,87	6,44
1- 0,075	7,5	515,31	6,52
1- 0,1	10	521,83	6,61
1- 0,25	25	528,44	42,85
1- 0,50	50	571,30	81,61
1-1.	100	652,90	217,63

**Tabela 10- Titulação do Flavílio 2 com ctDNA**

Proporção	[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	Vt ( $\mu\text{L}$ )	Vadd ( $\mu\text{L}$ )
1- 0,025	2,5	502,51	6,36
1- 0,075	7,5	515,32	6,52
1- 0,1	10	521,84	6,61
1- 0,25	25	528,44	42,85
1- 0,50	50	571,29	81,61
1-0,75	75	649,74	92,82
1-1.	100	652,90	217,63

Foram também realizadas duas experiências de competição entre o flavílio 1 e 2 com cada um dos ácidos nucleicos utilizados. Foram preparadas duas soluções contendo 1:1 flavílio 1 (100  $\mu\text{M}$ ) com flavílio 2 (100  $\mu\text{M}$ ) com TSP (40  $\mu\text{M}$ ) em tampão  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  100 mM pH=5 T=298 K. A estas duas soluções, uma foi titulada com 2,5  $\mu\text{L}$  de ácido (obtenção do espectro de RMN) e posteriormente adicionou-se mais 10  $\mu\text{L}$  de ácido nucleico. A experiência foi realizada nas mesmas condições para os dois ácidos nucleicos.

### III.4- Tempos de vida

A obtenção dos tempos de vida baseia-se nos acontecimentos que ocorrem de modo a obter-se uma percepção das diferenças de tempos de vida de estado excitado dos compostos flavílicos e da interação entre esses mesmos compostos e ácidos nucleicos. Foram medidos os tempos de vida para dois flavílios (1 e 2) com dois ácidos nucleicos (pApU e ctDNA) utilizando a técnica de contagem de fóton único ou SPC (*single photon counting*): *TemPro Fluorescence Lifesystem*, da marca *Horiba Jobin Yvon*. Foi utilizado um nanoLED de 570 nm (IBH) e o programa utilizado para análise dos decaimentos foi o próprio do equipamento (*DataStation*).

Foram realizadas medições dos tempos de vida dos flavílios na ausência e na presença dos ácidos nucleicos, sendo as medidas realizadas com três diferentes concentrações: 40  $\mu\text{M}$ , 120  $\mu\text{M}$  e 300  $\mu\text{M}$  para cada ácido nucleico.

A medição dos tempos de vida inicia-se com a obtenção do perfil do pulso de luz (do NanoLED) para posterior desconvoação do perfil de decaimento da amostra. A obtenção do perfil do pulso faz-se utilizando uma solução dispersante (Ludox), sendo também ajustado o nível e regime de contagens nesta fase. Após a obtenção do perfil do nanoLED procedeu-se à realização de decaimentos dos flavílios na ausência e na presença dos ácidos nucleicos. Foram realizados ensaios em triplicado, sendo estes realizados a pH=5.0.

### **III.5- Estudo da estabilidade de ácidos nucleicos na presença de Flavílios.**

O estudo da estabilidade de ácidos nucleicos na presença de flavílios baseia-se na desnaturação da amostra com o aumento da temperatura. Neste estudo foi utilizado o espectrofotômetro com uma bomba de água de aquecimento que, ao longo do tempo, aumentava a temperatura da amostra. A experiência realizou-se através do aumento de um grau por minuto sendo que a aquisição de espectros a 260 nm deu-se de 5 em 5 graus. As amostras utilizadas com brancos de ctDNA e Poly (A: U) foram preparadas em duas células de 2 mL e em cada célula encontrava-se uma solução com tampão fosfato com uma concentração de  $2 \times 10^{-4}$  de ácido nucleico. Posteriormente foram analisadas as estabilidades na presença de flavílios. Foram preparadas soluções a pH=5 com flavílios (concentração de  $1 \times 10^{-4}$ ) e com os ácidos nucleicos (concentração  $2 \times 10^{-4}$ ).

### **III. 6-Dicoísmo circular**

As titulações realizadas por CD tiveram como base as mesmas concentrações utilizadas por UV-Vis e fluorescência. As soluções de flavílio foram preparadas de fresco e fornecidos pelo laboratório *Biomolecular interactions and spetrosopy*, Zagreb.

## IV- Resultados e discussão

---



## IV.1- Estabilidade dos compostos flavílicos.

Para se proceder ao estudo de interação entre favílios e ácidos nucleicos, é necessário avaliar a evolução e a estabilização dos flavílios para traçar o seu perfil. Quando estável ao seu pH de trabalho, otimizou-se o procedimento experimental. Como o objetivo do trabalho é o estudo da interação da forma  $AH^+$  com ácidos nucleicos, definiu-se que o pH de trabalho seria pH=5 de modo a manter a estabilidade dos ácidos nucleicos, de modo que flavílio se encontre maioritariamente na forma  $AH^+$  e para trabalhar num pH próximo do fisiológico.

Ao pH de trabalho e recorrendo à figura 16 (I.4.1) é perceptível que existe um equilíbrio de espécies entre a forma ácida ( $AH^+$ ) e a sua base conjugada (CB), sendo necessário estudar a evolução da solução até esta atingir o equilíbrio para ser possível otimizar o estudo de interação.

### IV.1.1 Flavílio 1:

As medidas de absorvância e fluorescência para o flavílio 1 foram obtidas com intervalos de tempo diferentes apenas para observação da evolução do composto ao longo do tempo, sendo que estes variam entre as 0 horas (solução preparada de fresco) e as 52 horas.

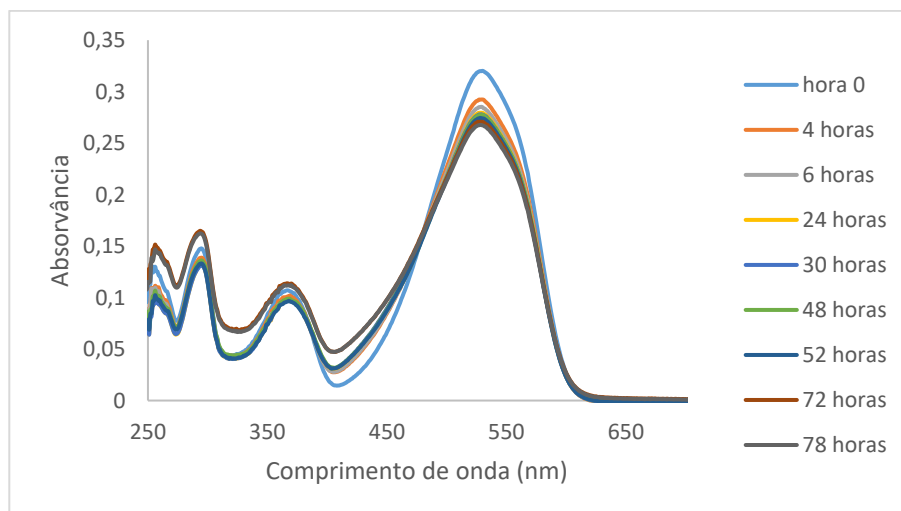
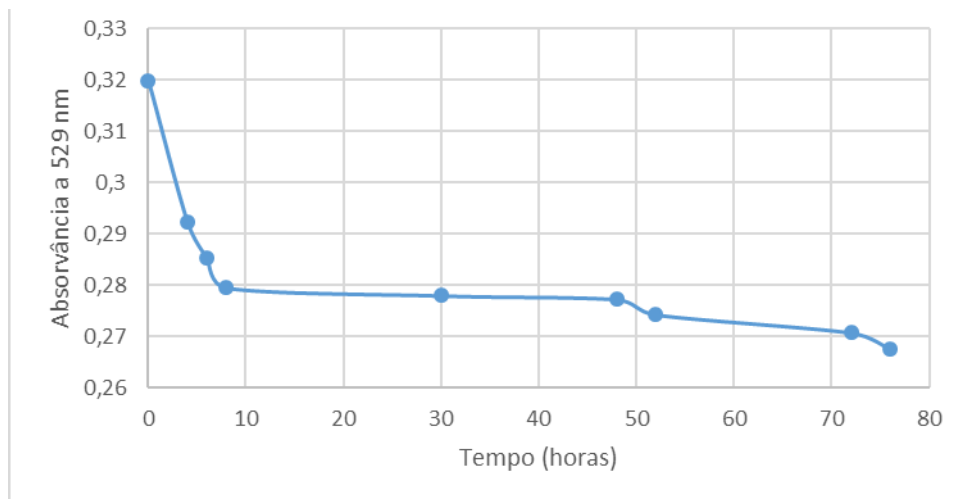


Figura 28- Estabilização do Flavílio 1 a pH=5 ao longo do tempo.

Por análise à figura 28, é possível perceber que a estabilização do salto de pH é bastante lenta, sendo que, à medida que o tempo passa, a evolução das espécies tende para o equilíbrio. A partir da 6ª hora, a evolução de sistema torna-se lenta evoluindo pouco até às 52 horas. Como descrito anteriormente, a distribuição de espécies teórica indica que ao pH de trabalho irá existir um equilíbrio de espécies entre o ácido ( $AH^+$ ) e a sua base conjugada (CB). De modo a constatar que os equilíbrios em solução continuam a evoluir ao longo do tempo, foi alargado o período de estabilização até 78 horas. O sistema continua a evoluir ao longo do tempo com uma velocidade

menor. Deste modo foi possível definir o tempo de estabilização do salto de pH de 2 para 5, sendo que se escolheu deixar estabilizar a solução durante 24 horas.

Na evolução ao longo do tempo, é possível observar a formação da base quinoidal (A) sendo esta, a nível espectral, a 574 nm aproximadamente.

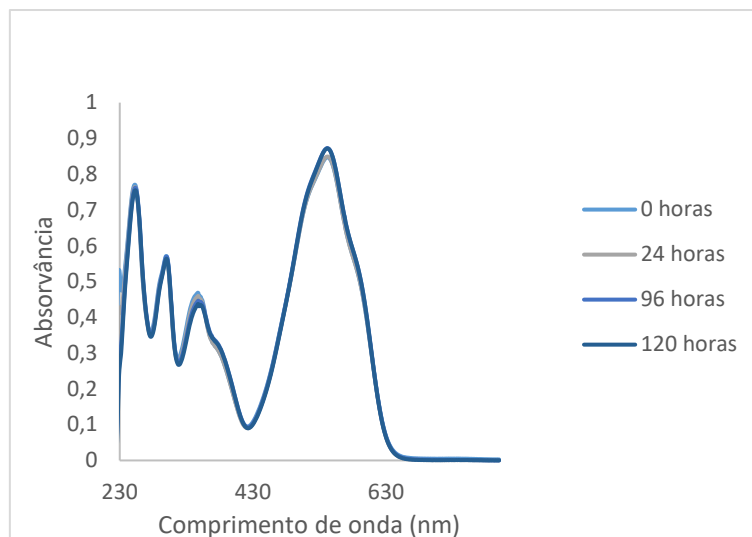


**Figura 29- Evolução da estabilidade do flavílio ao longo do tempo a 529 nm.**

Segundo o valor máximo de absorvância a 529 nm (pico correspondente  $AH^+$ ) verificamos que a estabilidade do flavílio, é rápida nas dez primeiras horas, adquirindo uma espécie de cinética lenta ao longo do tempo. Como o valor de diferenças de absorvâncias entre as 24 horas e as 78 é certa de 0,01, pelo que se considera que a solução de flavílio se encontra estabilizada (figura 29).

#### **IV.1.2- Flavílio 2:**

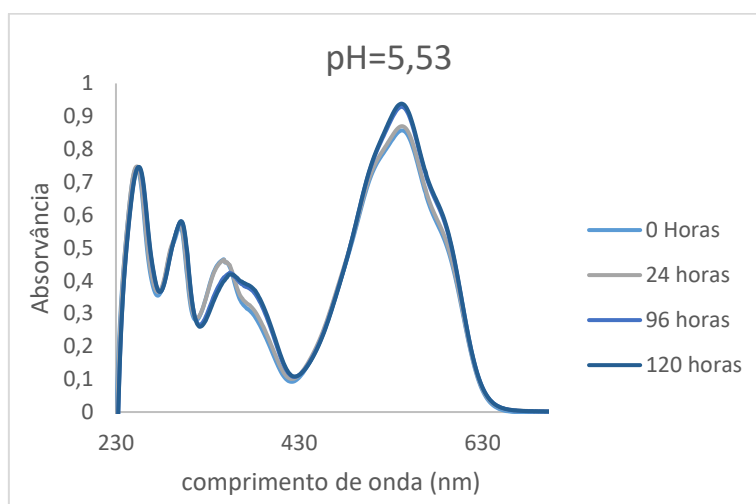
Como no início do trabalho experimental não se encontrava nada reportado sobre o flavílio na literatura, iniciou-se o estudo fazendo-se a caracterização do flavílio correndo uma gama de pH de 2 a 11 de modo a conseguir-se detetar as espécies que se formam, ao longo do tempo, quando o flavílio se encontra exposto a diferentes pHs.



**Figura 30- Evolução do flavílio 2 a pH=2,41**

Ao pH mais ácido (figura 30), verifica-se a formação de 4 bandas, sendo que a maior apresenta um máximo a 542 nm que corresponde à forma protonada do flavílio, sendo esta a forma mais estável. Por comparação com a literatura, verificamos que se o pH de estudo fosse mais baixo, existiria uma forma duplamente protonada do flavílio, devido à protonação da amina e do O do anel B – Figura 32. Neste pH, a solução possui uma coloração vermelha escura, apesar do comprimento de onda no máximo de absorvância não se encontrar na região do vermelho, devido à forte ligação que é formada entre o anel A e o átomo de azoto e estas estarem envolvidas num sistema de conjugação de cargas nas proximidades do átomo de azoto.

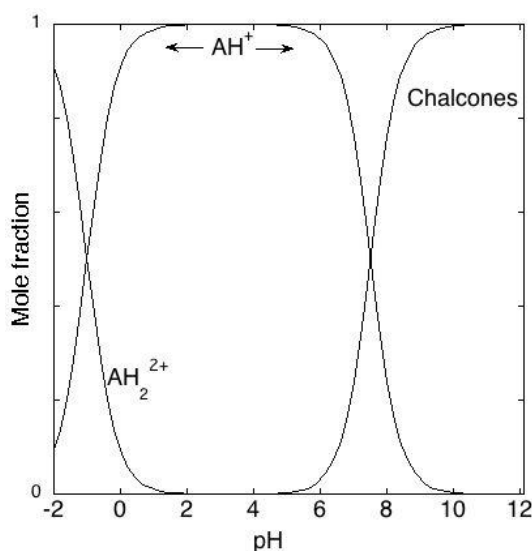
Com a subida no valor de pH observa-se a formação da base quinoidal e ao atingir-se pH=5,53, verifica-se de forma mais acentuada, como é visível na figura 31.



**Figura 31- Evolução do flavílio 2 a pH=5,53**

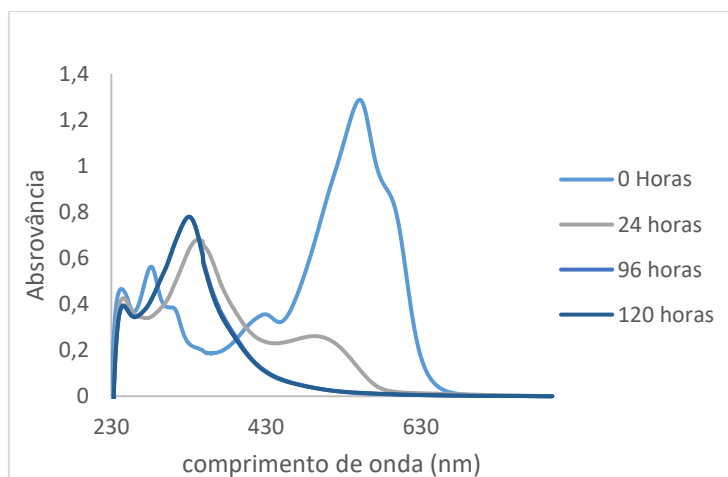


A base quinoidal é detetada, aquando do aumento do pH se observa uma descida menos repentina na absorvância (parece que se forma um ombro na banda) a 574 nm. Na figura 31, é perceptível que ao longo do tempo a banda tende a estabilizar na forma da base quinoidal. Neste pH existe um equilíbrio de espécies entre  $AH^+$  e  $AH$  (figura 32). Por comparação da figura 30 com a figura 31, é perceptível uma alteração do espetro na região dos 400 nm.



**Figura 32- Distribuição de espécies do Flavílio 2 <sup>28</sup>**

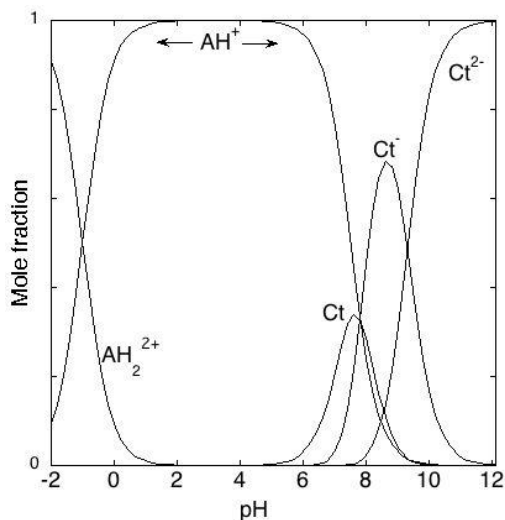
Na região de pH=8,25 denota-se uma grande diminuição da absorvância por parte das regiões enunciadas anteriormente e o aparecimento de uma banda na região dos 330 nm que nas soluções com pH mais básico foi possível caracterizar.



**Figura 33- Monitorização da evolução do flavílio a pH=11,4**

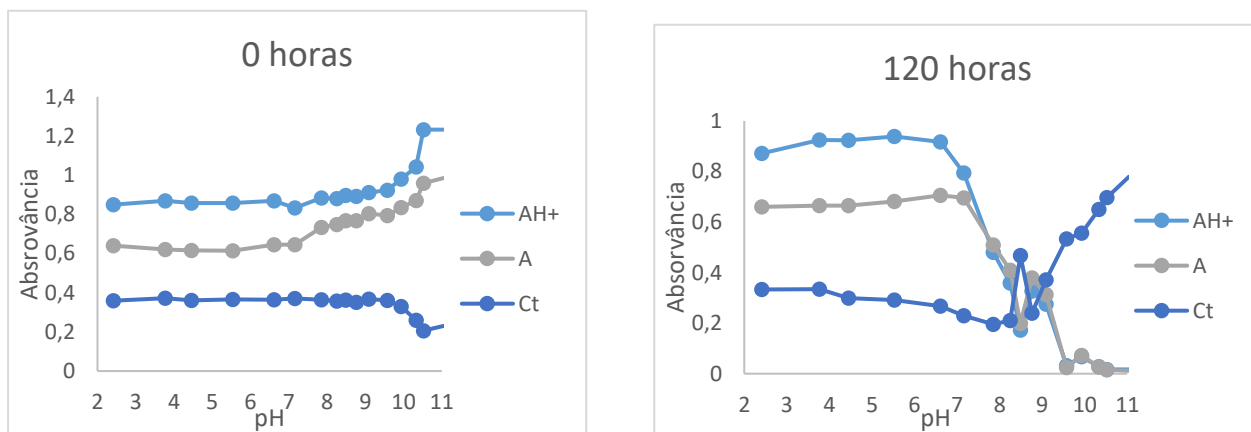
Através da análise da figura 33, é possível detetar a banda a 330 nm sendo esta correspondente à forma Ct do flavílio. Recorrendo ao capítulo I.4 (I.4.1- figura 17) e à literatura<sup>27</sup> a espécie Ct é a espécie que a pH mais básicos é a termodinamicamente mais estável e, comparando com literatura, observam-se as bandas características da espécie em solução, indica que estamos perante a forma *trans* da espécie chalcona. Com auxílio da literatura,

verifica-se que a forma Ct possui três formas com o aumento do pH. Os produtos do equilíbrio da espécie chalcona são Ct (pH≈5,5-8), Ct<sup>-</sup> (pH≈6-12) e Ct<sup>2-</sup> (pH≈8-12) (figura 34).



**Figura 34- Diferentes estados das espécies do Flavílio 2.<sup>28</sup>**

Após o processamento dos dados obtidos, monitorizou-se o desenvolvimento das espécies destacadas ao longo da experiência de caracterização obtendo-se deste modo o diagrama de espécies do flavílio 2.



**Figura 35- Evolução das espécies a diferentes pH entre as 0 horas (esquerda) e 120 horas (direita).**

A figura 35 representa a distribuição de espécies do flavílio no momento da preparação da solução e 120 horas depois, sendo que foram obtidos dados nos tempos 0, 24, 96 e 120 horas. Os dados obtidos no momento 0 não coerentes com o que é previsto. A espécie protonada e a base quinoidal parecem aumentar a absorvância ao longo do pH sendo que a forma Ct mantém uma absorvância continua até pH básico, diminuindo a absorvância a esses pH. Com a evolução do sistema, ao fim de 24 horas, o diagrama de espécies mostra o esperado, obser-

vando-se uma grande absorvância a pH ácido ao passo que com o aumento do pH há o desaparecimento das espécies. Esse desaparecimento encontra-se associado ao aparecimento da forma Ct, como seria de esperar visto que nos encontramos numa zona em que o  $\text{pH} < \text{pK}_h$ .

Foi definido que ao fim de 24 horas se consideraria a solução equilibrada, sendo que o estudo de estabilização foi feito em paralelo com a caracterização. Apesar se verificar uma diferença substancial entre as 24 horas e as 120 na figura (ultimo pH), o tempo de estabilização foi definido para 24 horas visto que a diferença de absorvância observada na banda a 574 nm (figura 31) é mínima ao pH de trabalho das titulações.

Deste modo é possível afirmar que ao pH de trabalho, a espécie que se encontra maioritariamente em solução é a forma do catião flavílio, sendo esta a espécie de interesse de estudo.

#### IV.1.3- Flavílio 3:

Foram realizados estudos de estabilidade semelhantes aos realizados para o Flavílio 2, mas este demonstrou que no período de tempo em que se estudava a estabilização, estes sofriam uma degradação alta quando deixados em solução a  $\text{pH}=5$ . Deste modo e de maneira a avaliar se o mesmo era estável ao longo da titulação, adotou-se uma estratégia diferente na avaliação deste flavílio de modo obter-se uma perceção sobre a estabilidade do flavílio para o tempo requerido para uma titulação (sensivelmente duas horas).

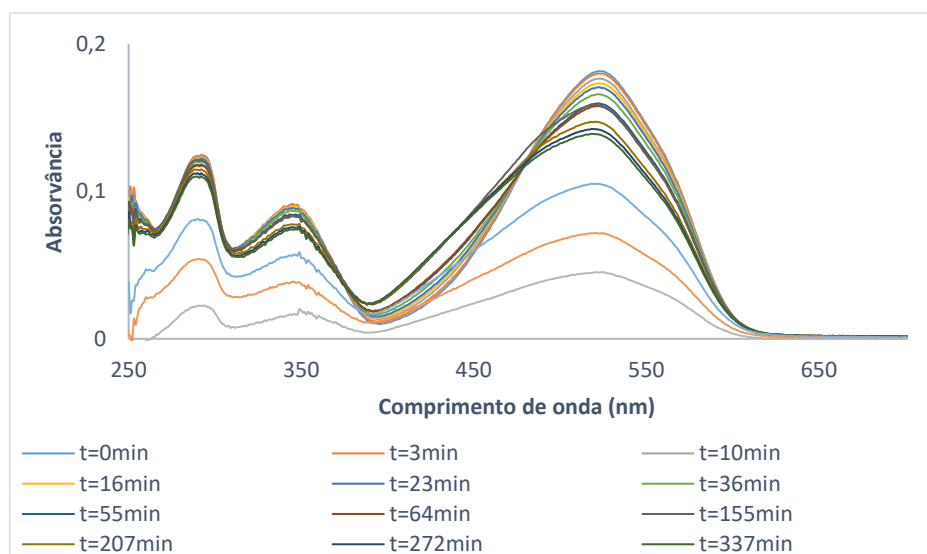
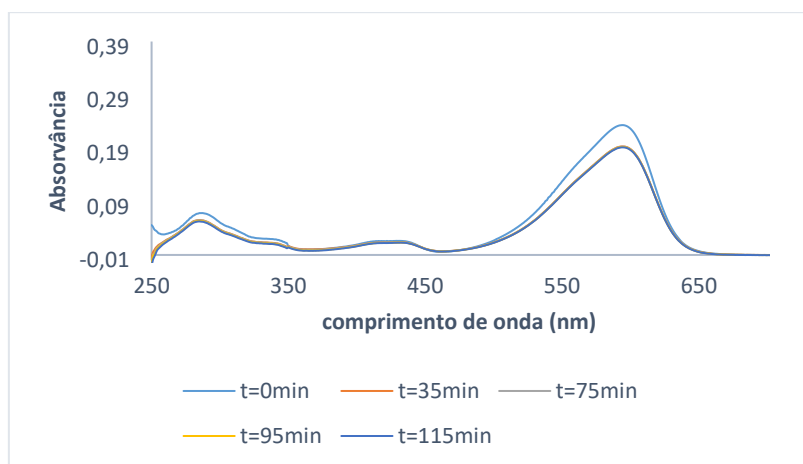


Figura 36- Estudo da evolução do flavílio 3 ao longo do tempo após o salto de pH.

Por observação dos resultados obtidos (figura 36), verifica-se que o flavílio evolui ao longo do tempo e que esta evolução está acompanhada por uma diminuição da absorvância significativa. Como o tempo requerido para a titulação é aproximadamente duas horas, verifica-se que o flavílio a pH=5 mantém condições favoráveis para a titulação até aos 155 minutos, sendo que posteriormente a esse tempo se verifica uma diminuição bastante abrupta da absorvância. Como os 155 minutos são suficientes para o tempo da titulação, as mesmas foram realizadas e discutidas na seção IV.2.3.

#### IV.1.4- Flavílio 4:

Devido aos problemas detetados com o flavílio 3, realizou-se a mesma estratégia para o flavílio 4 (figura 37).

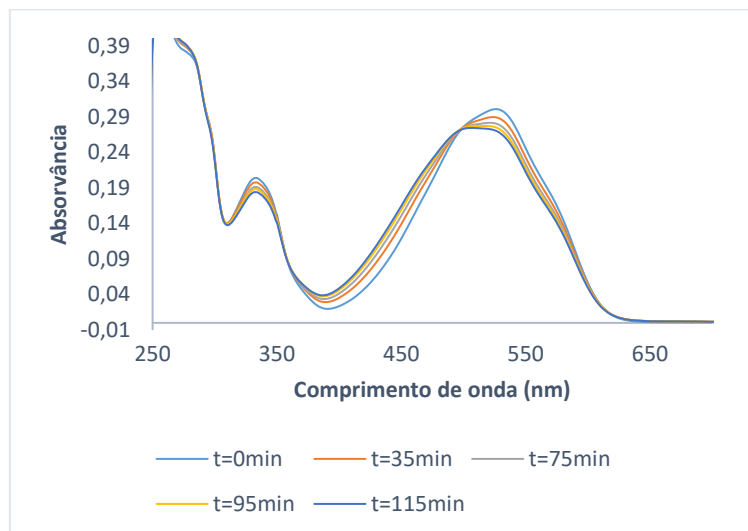


**Figura 37- Representação gráfica dos espectros obtidos no estudo da evolução do flavílio 4 ao longo do tempo aquando do salto de pH.**

Ao longo do estudo, verificou-se que este possuía uma maior estabilidade ao longo do tempo, apresentando uma cinética de equilíbrio bastante rápida, tendo mesmo equilíbrio sido atingido 35 minutos após o salto de pH. Como não se verificou alteração do espectro de absorvância deste flavílio até aos 115 minutos (aproximadamente duas horas), realizaram-se as titulações com o mesmo devido a estabilidade apresentada.

#### IV.1.5- Flavílio 5:

A avaliação da estabilização do flavílio 5 foi realizada da mesma forma que para os dois anteriores.



**Figura 38- Representação gráfica do estudo da evolução do flavílio 5 ao longo do tempo a pH=5.**

Os resultados obtidos, indicam que o flavílio apresenta uma cinética de estabilização lenta (figura 38), sendo que este demora cerca de 115 minutos até ser estável para as titulações. Verifica-se também um desvio hipsocrômico (deslocamento da banda para comprimento de onda inferiores) por parte da banda do flavílio, formação de uma nova espécie, acoplada a uma diminuição da absorvância a  $\approx 550$  nm.

## **IV.2- Estudo da interação de flavílios com ácidos nucleicos**

Quando existe interação entre duas moléculas, esta obedece a uma determinada cinética e, neste trabalho, foi realizada uma análise prévia da cinética de interação entre flavílios e ácidos nucleicos, com o intuito de determinar o tempo para o qual, após a adição de ácido nucleico à solução de flavílio, se verifique reação de interação que seja capaz de ser perceptível a nível espectroscópico, a interação entre as duas moléculas.

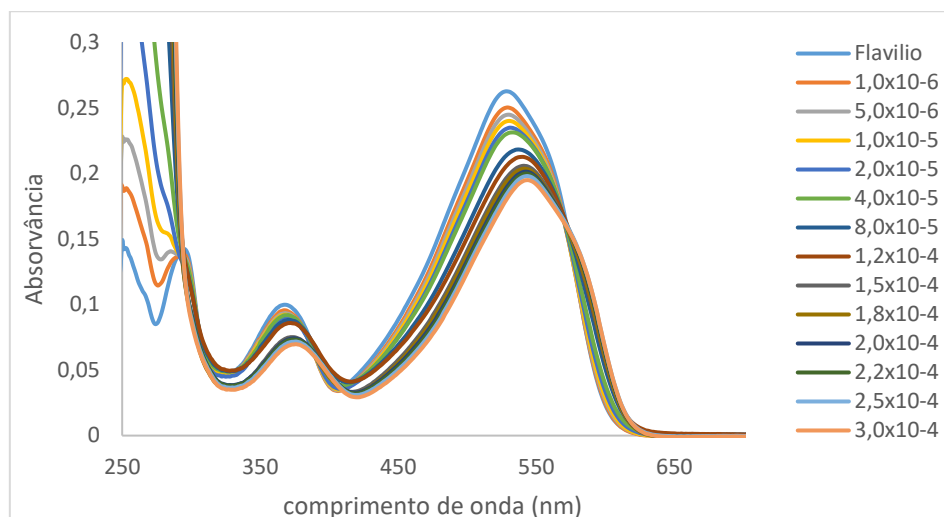
Após proceder ao estudo da caracterização dos flavílios, e antes de iniciar o estudo de interação com ácidos nucleicos, procedeu-se a uma pequena titulação com três concentrações de poly (A: U) e de ctDNA diferentes em 3 células tendo sido obtidos espectros por absorção e fluorescência ao longo do tempo.

Com o estudo da cinética para a obtenção do tempo necessário para que se iniciasse a reação, foram medidos espectros de absorvância e de fluorescência ao longo do tempo (abs tempos- 0, 2,4,7,10,12,17 e 40 minutos; fluorescência tempos: 1,3,5,9,11,13,15, 18 e 41 minutos). Os resultados obtidos demonstraram que se atinge o equilíbrio rapidamente no início, sendo que, e fazendo uma média dos resultados obtidos, foi decidido fazer um tempo de espera de 3 minutos após a adição de ácido nucleico para que se observe interação entre o flavílio e o ácido nucleico. O tempo de espera, tendo em conta os resultados obtidos, foi o mesmo para todos os estudos de interação.

#### IV.2.1- Flavílio 1:

Poly (A: U):

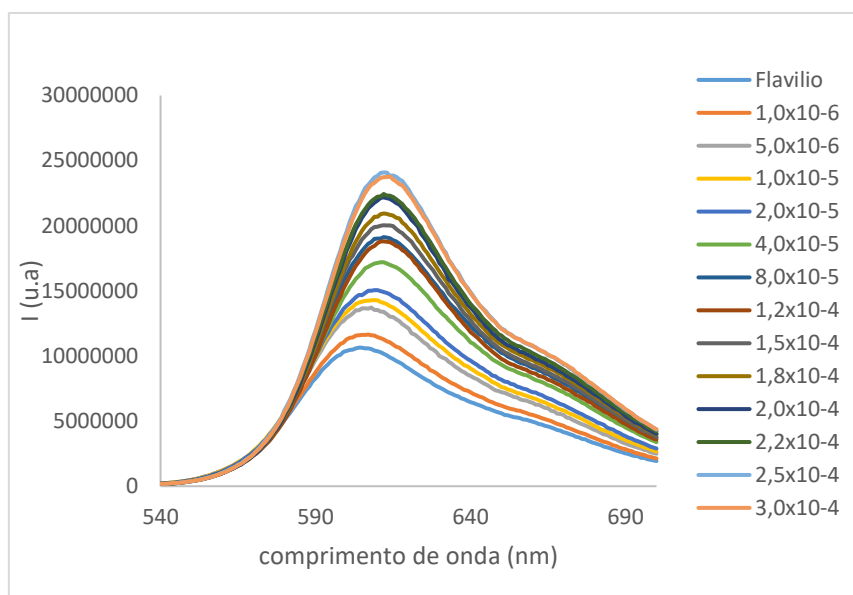
O flavílio 1, em solução com Poly (A: U), apresenta alterações espectrais, tanto a nível de absorção como de emissão, ao longo da titulação sendo estas notadas através da diminuição da absorção e emissão, assim como através de desvios de comprimento de onda (figura 39).



**Figura 39- Sobreposição dos espectros obtidos da titulação do Flavílio 1 com Poly (A: U)**

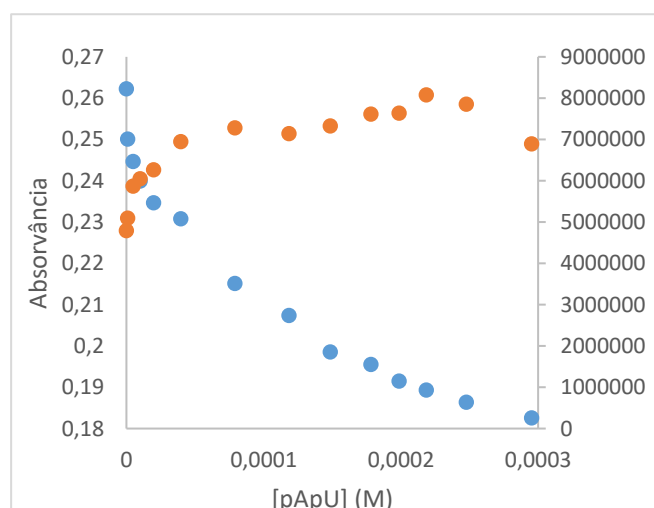
O flavílio 1 possui um máximo  $\approx 530$  nm e quando é titulado com Poly (A: U), nos primeiros pontos, verifica-se um efeito hipsocrômico (diminuição da intensidade de absorção) até à concentração de  $4 \times 10^{-5}$  M de Poly (A: U).

Entre a concentração  $4 \times 10^{-5}$  M e  $8 \times 10^{-5}$  M (representado na figura 39), verifica-se uma acentuação do efeito hipsocrômico e observa-se o aparecimento de um efeito batocrômico, ou seja, existe uma maior diminuição da intensidade de absorção e ao mesmo tempo verifica-se um desvio do comprimento de onda máximo de absorvância para maiores comprimentos de onda (menor energia- desvio para o vermelho de 530 nm para 544 nm). Estes efeitos são visíveis nos restantes pontos da titulação. A sobreposição dos espectros da titulação demonstra dois pontos isobésticos, ou seja, demonstra a existência de dois comprimentos de onda a absorvância não se altera apesar da alteração da concentração.



**Figura 40- Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos na titulação com Poly (A: U).**

O espectro de emissão (figura 40), apresenta claro aumento da intensidade de fluorescência ao longo da titulação. O aumento da intensidade é maior nos primeiros pontos, verificando-se um aumento mais gradual e menor nos últimos pontos da titulação. Para além do aumento da intensidade, verifica-se um desvio do comprimento de onda máximo de fluorescência (de 607 nm para 612 nm), nos primeiros pontos da titulação ( $\approx 1,2 \times 10^{-4}$  M), sendo este desvio para maiores comprimentos de onda (batocrômico).



**Figura 41- Variação da absorvância (530 nm) e intensidade de fluorescência (544 nm) ao longo da titulação.**

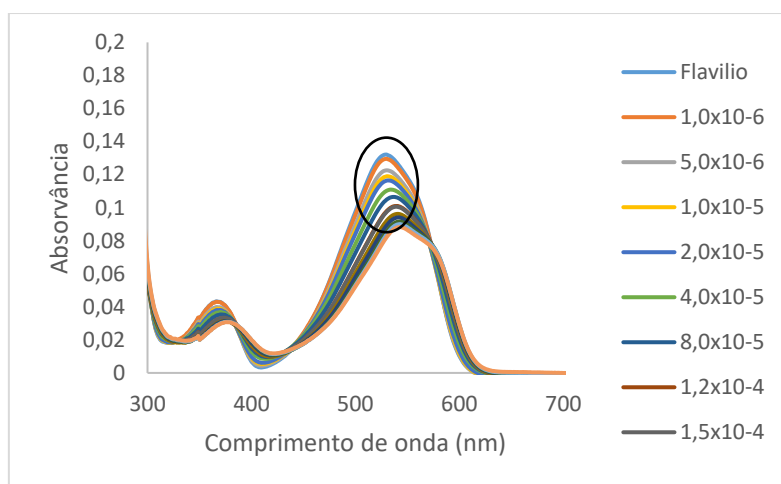


A figura 41 demonstra a evolução dos máximos observados, tanto de absorção com de emissão, ao longo da titulação no comprimentos de onda (530 nm ; 607nm) e (544 nm; 612 nm), correspondente aos máximo do flavílio. Este demonstra o que já foi observado na sobreposição dos espectros de absorção e emissão ao longo da titulação, ou seja, uma diminuição da absorção acoplado a um aumento da emissão.

Os resultados obtidos no estudo de interação do flavílio 1 com Poly (A: U) indicam que existe uma interação entre ambos quando estão em solução. O efeito observado na diminuição da absorvância e aumento de fluorescência acoplado a desvios no comprimento de onda máximo de absorvância, são caraterísticos de interação entre moléculas.

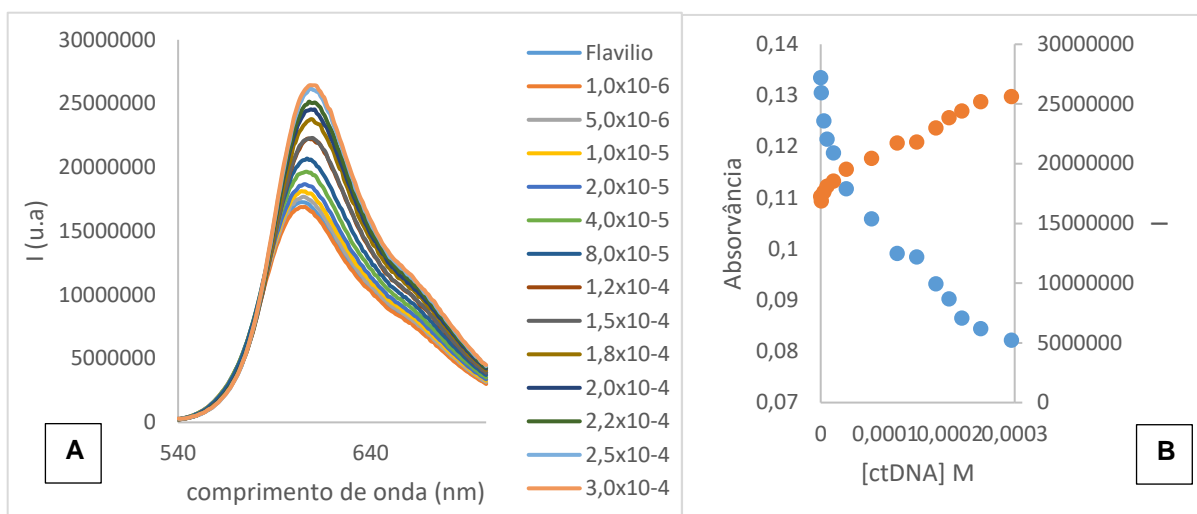
#### ctDNA:

Na titulação do flavílio 1 com ctDNA, verifica-se uma grande alteração da banda característica do flavílio, observando-se uma diminuição da absorção acoplado a um desvio do comprimento de onda (figura 42).



**Figura 42- Sobreposição gráfica dos espectros de absorção da titulação do flavílio 1 com ctDNA.**

Ao longo de toda a titulação, observa-se uma diminuição gradual da absorvância do comprimento de onda máximo característico do catião flavílio (efeito hipsocrômico) sendo esse acompanhado por um deslocamento batocrômico no comprimento de onda máximo de absorção do flavílio (530 nm para 546 nm). A sobreposição dos espectros obtidos ao longo da titulação (figura 42) permite a visualização de um esbatimento da banda característica do catião flavílio, observando-se (bola preta) que a região do espectro característica da base quinoidal apresenta uma acentuação, em relação aos pontos iniciais e o máximo de 530 nm, que pode representar alterações da estrutura do flavílio quando este se encontra em solução com o ctDNA, ou seja, as alterações espectrais que se verificam indicam que existe uma interação entre o flavílio e o ctDNA, sendo que esta interação poderá provocar alterações na estrutura do flavílio verificando-se um maior equilíbrio entre espécies, em solução, de AH e AH<sup>+</sup>.

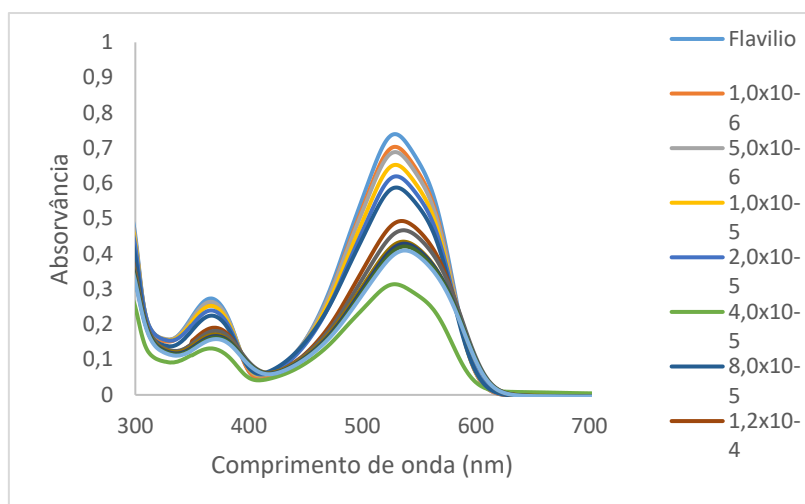


**Figura 43- A) Sobreposição dos espectros de fluorescência obtidos na titulação com ctDNA. B) Variação da intensidade de fluorescência (607 nm) e de absorção (530 nm) ao longo da titulação.**

O espectro de emissão do flavílio (figura 43-A), quando titulado com ctDNA, demonstra um aumento da intensidade de fluorescência ao longo da titulação, acoplado a um desvio no comprimento de onda do máximo de intensidade de fluorescência (607-612 nm- desvio para o vermelho) sendo estes caraterísticos de alteração das propriedades do flavílio em solução, ou seja, a existência de uma interação entre as moléculas. A figura 43-B demonstra a cinética apresentada pela titulação, onde é possível observar a diminuição da absorvância associada a um aumento da intensidade do flavílio.

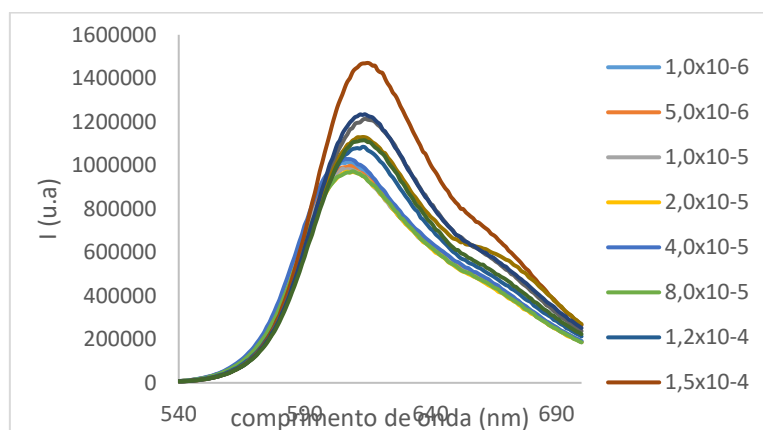
**Poly (A: T):**

Quando o flavílio 1 é titulado com Poly (A: T), tal como com os ácidos nucleicos anteriormente discutidos, apresenta uma diminuição da absorvância do comprimento de onda associado a um desvio do comprimento de onda ao longo da titulação (figura 44).



**Figura 44- Sobreposição gráfica dos espectros de absorção obtidos na titulação do flavílio 1 com Poly (A: T).**

Por observação da sobreposição dos espectros de absorção, denota-se uma diminuição gradual da absorvância nos primeiros pontos da titulação, sendo que esta parece ser mais abrupta quando o ácido nucleico se encontra em solução com a concentração de  $1,2 \times 10^{-4}$  M não sendo real esta percepção pois existe um erro experimental associado ao ponto  $4 \times 10^{-5}$ . Observa-se um batocrômico ao longo da titulação, assim como um ponto isobéstico a  $\approx 590$  nm.



**Figura 45- Espectros de fluorescência ao longo da titulação do flavílio 1 com Poly (A: T).**

Os espectros de emissão deste flavílio com Poly (A: T) (figura 44), apresentam alguns erros associados nos últimos pontos, mas é perceptível que existe uma diminuição da intensidade de emissão do flavílio até  $8 \times 10^{-5}$ , estando esta associada a um pequeno desvio no comprimento de onda. Com o decorrer da titulação, verifica-se que o desvio batocrômico é maior do que no início da titulação (603-614 nm) e este aumento do comprimento de onda de intensidade de fluorescência máxima encontra-se associado a um aumento da intensidade de fluorescência (figura 45), o que pode ser indicativo de que a interação entre flavílio e o ácido nucleico pode gerar alterações no meio químico que rodeia o flavílio.

Poly (G: C)

A titulação realizada com Poly (G: C), demonstra um comportamento idêntico ao apresentado aquando titulado com outros ácidos nucleicos com exceção do desvio do comprimento de onda, ou seja, verifica-se uma diminuição da absorvância ao longo da titulação sendo que não se verificam alterações a nível do espectro do composto. Esta diferença poderá indicar um diferente de tipo de interação entre o flavílio 1 e Poly (G: C) como é possível observar no espectro de absorção.

#### IV.2.2- Flavílio 2:

Poly (A: U):

A titulação do flavílio 2 com Poly (A: U) revela grandes variações espectrais a nível de espécies em solução, alteração de absorvância e comprimento de onda de absorvância máxima.

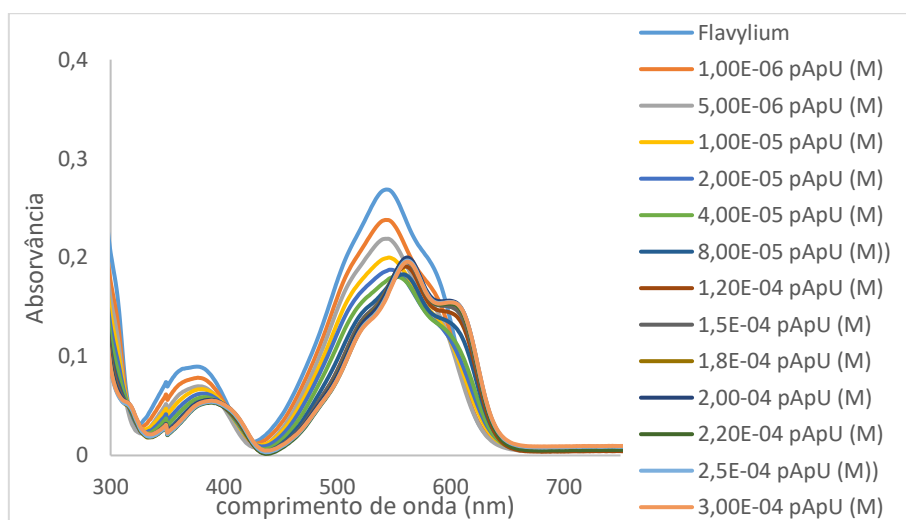
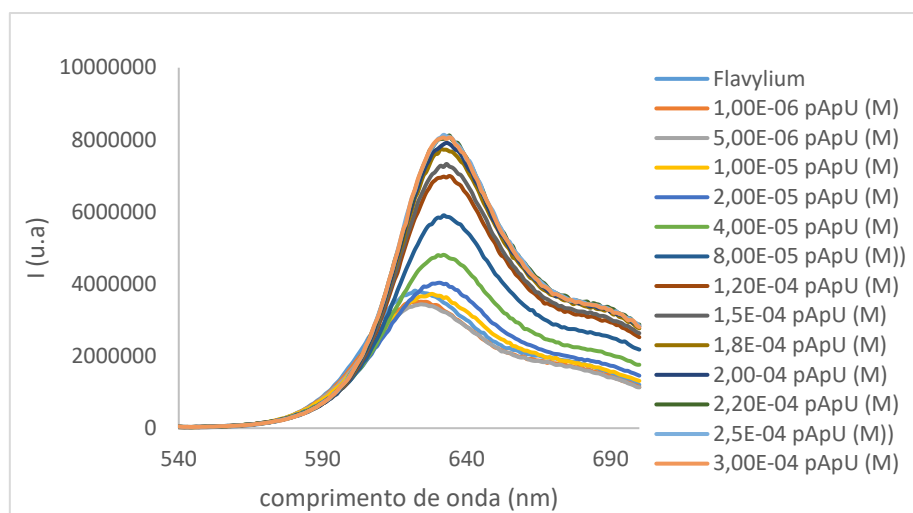


Figura 46- Espectros de absorção da titulação do flavílio 2 com Poly (A: U).

Como indicado na figura 46, observa-se um efeito hipsocrômico gradual com um ligeiro desvio do comprimento de onda máximo até à concentração de  $1 \times 10^{-5}$ , sendo que, após este ponto, observa-se uma alteração nas bandas de absorvância tendo estas um desvio para comprimento de onda maiores (desvio batocrômico) e um súbito aumento da absorvância. Associado a este aumento de absorvância, dá-se o aparecimento da banda correspondente à espécie AH podendo estar este fenómeno relacionado com alterações do meio em redor do flavílio, ou seja, (como foi discutido para a titulação do flavílio 1 com ctDNA) o flavílio 2 ao interagir com o Poly (A: U) poderá formar outras espécies. Neste caso, a forma do catião encontra-se em maioria pois possui um valor de absorvância maior (concentração mais elevada- Lei de *Lambert Beer*).



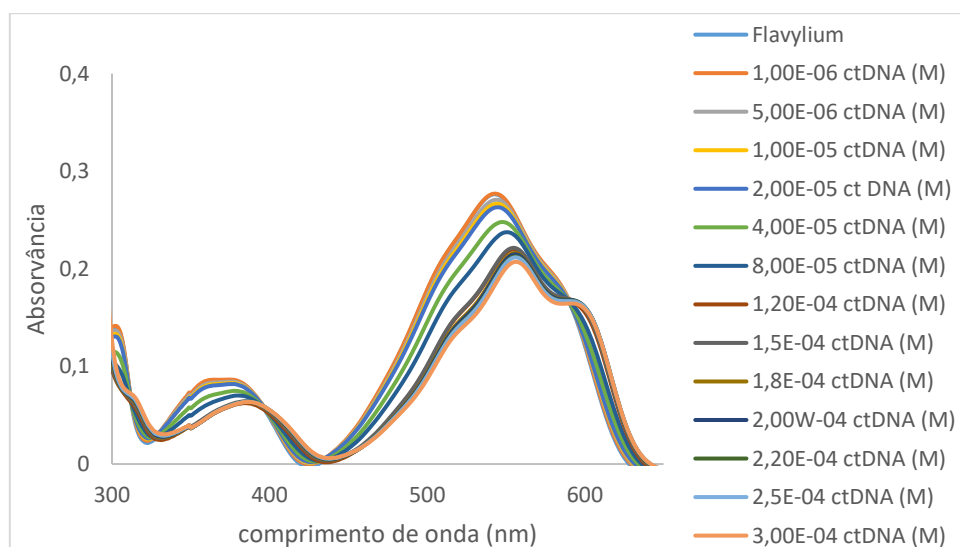
**Figura 47- Espectros de fluorescência obtidos ao longo da titulação do flavílio 2 com Poly (A: U).**

Os espectros de fluorescência (figura 47), demonstram que nos primeiros pontos da titulação (até  $1 \times 10^{-5}$ ) existe uma diminuição da intensidade de fluorescência, sendo que, com o decorrer da titulação, ocorre um desvio batocrômico do espectro e um aumento abrupto da intensidade de fluorescência.

Os resultados obtidos através da titulação de Flavílio 2 com Poly (A: U) indicam a existência de uma interação entre espécies, assim como possíveis alterações na termodinâmica do flavílio capazes de gerar outras espécies do mesmo.

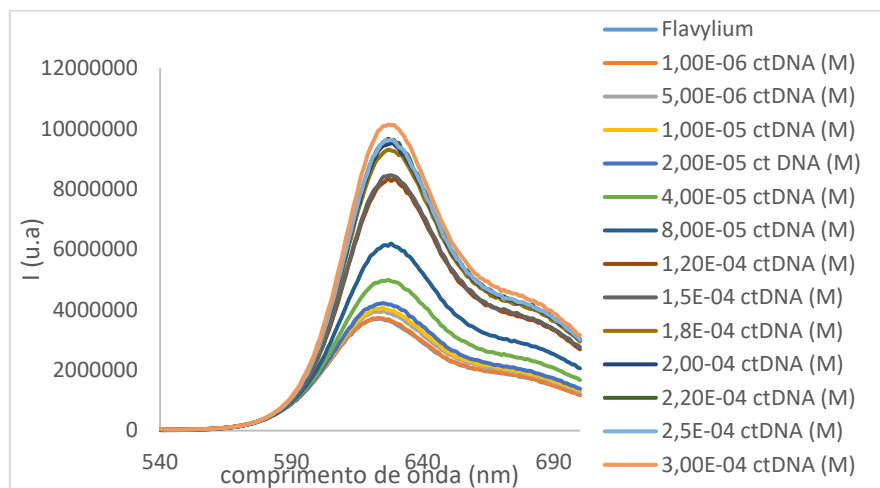
#### ctDNA:

A titulação do flavílio 2 com ctDNA indica resultados muito parecidos ao discutido aquando da titulação com Poly (A: U) a concentrações mais elevadas.



**Figura 48- Titulação do flavílio 2 com ctDNA por UV-Vis.**

A figura 48 indica que no início da titulação, não se verifica grandes alterações do espectro de absorvância, sendo que, ao atingir-se o patamar intermédio titulação, denota-se um aumento da diminuição de absorvância que se encontra acoplada a um efeito batocrômico, tendo estes efeitos diretos no aparecimento de uma banda na zona característica da base quinoidal. Tal como enunciado anteriormente, esta variância espectral pode dever-se a uma alteração do ambiente químico do flavílio quando interage com o ácido nucleico.



**Figura 49- Titulação flavílio 2 com ctDNA por fluorescência.**

Os espectros de emissão (figura 49) apresentam um comportamento idêntico aos de absorção, observando-se um pequeno aumento de intensidade de fluorescência do flavílio sendo que, acopolado a um desvio do comprimento de onda para o vermelho, verifica-se um aumento elevado da intensidade de fluorescência do flavílio.

Tanto o espectro de absorção como o de emissão enunciam que quando se encontra na solução de flavílio uma concentração superior a  $2 \times 10^{-5}$  de ctDNA, existe uma acentuação do desvio batocrômico associado a um aumento de absorvância e intensidade de fluorescência, respetivamente.

**Poly (A: T):**

Os resultados de absorção obtidos nesta titulação não podem ser analisados de forma correta pois possuem vários erros associados, relacionados com o espectrofotómetro utilizado. O problema verificado afetou todos os espectros de absorção das titulações de Poly (A: T) com todos os flavílios.

A sobreposição de espectros de fluorescência, ao longo da titulação, indicam um desvio batocrômico durante os primeiros pontos da titulação, estabilizando no ponto  $2 \times 10^{-5}$  M. Verifica-se um ligeiro aumento de intensidade de fluorescência nos primeiros pontos de titulação (pontos

associados ao desvio do comprimento de onda), sendo posteriormente seguido de um aumento abrupto da intensidade estabilizando nos pontos finais da titulação.

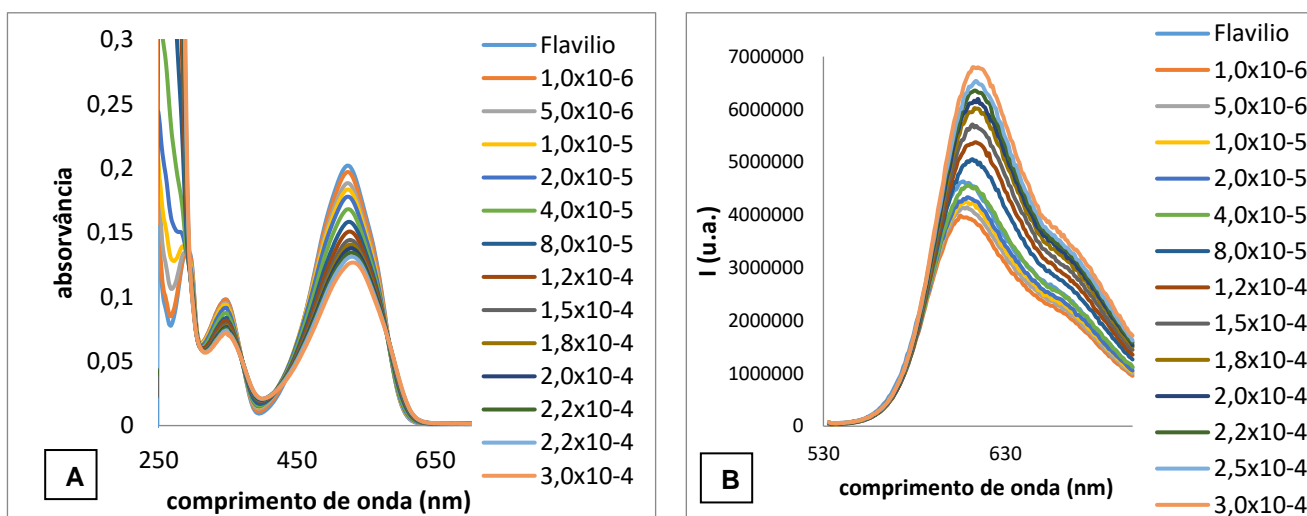
Apesar de não ser possível obter informação acerca do comportamento espectral ao longo da titulação, os dados obtidos por fluorescência são indicativos de uma interação.

Poly (G: C):

A titulação do flavílio com Poly (G: C) indica, pelos espectros de absorção, que existe uma grande alteração da absorvância entre o espectro obtido apenas com o flavílio e o obtido quando este é titulado com  $1 \times 10^{-6}$  M de ácido nucleico, sendo esta acompanhada por um desvio para a região do vermelho. Os espectros de absorção obtidos durante a titulação indicam que possivelmente existe algum tipo de interação e tal é perceptível na grande alteração de absorvância que se verifica entre o espectro do flavílio e o do flavílio com  $1 \times 10^{-6}$  M de Poly (G: C).

#### IV.2.3- Flavílio 3:

Poly (A: U):



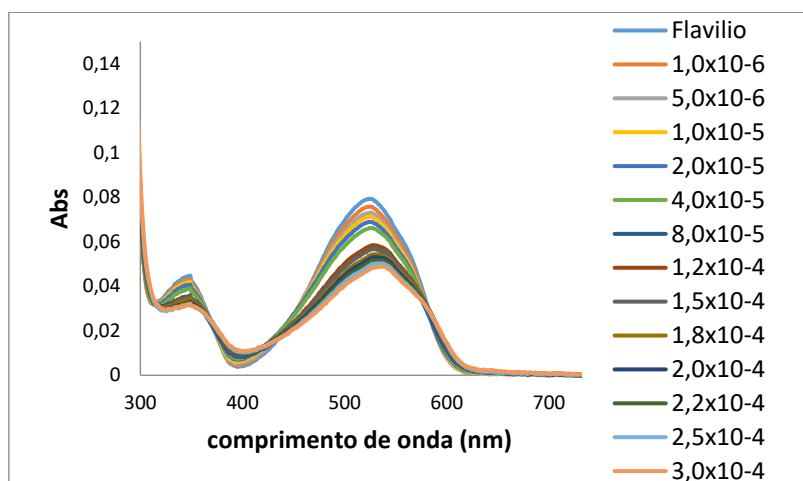
**Figura 50- A) Espectros de absorção e B) espectros de emissão da titulação do flavílio 3 com Poly (A: U).**

Tanto os espectros de absorção como os de emissão obtidos através da titulação do flavílio 3 com Poly (A: U), apresentam pequenos desvios do comprimento de onda para a região do vermelho, associados a uma diminuição gradual da absorvância do comprimento de onda máximo (absorção- Figura 50-A) com o decorrer da titulação. No caso da emissão, verifica-se que ao longo da titulação dá-se um aumento gradual da intensidade de fluorescência (figura 50-B) associada a um desvio para comprimentos de onda mais elevados.

Dos flavílios até então estudados, o flavílio 3 parece ser o que possui menos afinidade com o Poly (A: U) mas demonstra alterações nos resultados o que é um possível indicativo de interação entre o flavílio e o ácido nucleico.

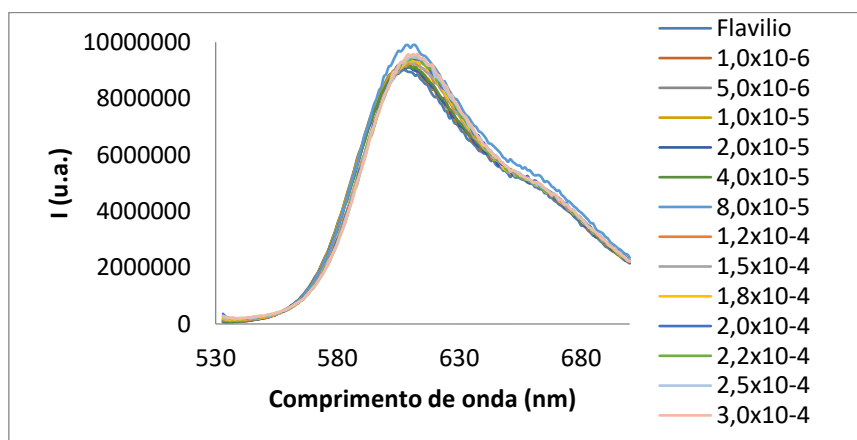
ctDNA:

O flavílio 3 ao ser titulado com ctDNA, apresenta um comportamento diferente do apresentado aquando titulado com Poly (A: U) (figura 51 e 52).



**Figura 51- Titulação flavílio 3 com ctDNA por UV-Vis.**

Os espectros de absorção indicam que quando existe baixa concentração de ctDNA em solução, o sistema evolui de maneira a que se verifica uma pequena diminuição da absorvância, sendo esta abrupta quando se encontra em solução a concentração de  $8 \times 10^{-5}$  M de ácido nucleico sendo que nos restantes pontos, esta diminuição de absorvância é gradual e de baixo valor. A principal diferença que se deteta na comparação das figuras 50 e 51 é a acentuação da banda correspondente à espécie AH na titulação com ctDNA, algo que não é observável na titulação com Poly (A: U).



**Figura 52- Espectros de emissão da titulação do flavílio 3 com ctDNA.**

O espectro de fluorescência da titulação indica um pequeno desvio do comprimento de onda para a região do vermelho associado a um aumento da intensidade de fluorescência. Os



dados obtidos através da titulação do flavílio 3 com ctDNA demonstram uma alteração na banda característica do catião flavílio, ou seja, alterações no ambiente químico do flavílio (assim como a diminuição de absorvância, aumento de fluorescência e desvio do comprimento de onda) que poderá ser indicio que existe interação entre o ácido nucleico e o flavílio.

Poly (A: T):

Por análise dos espectros de emissão obtidos ao longo da titulação entre o flavílio e o ácido nucleico, onde se verifica uma diminuição da intensidade de fluorescência acoplado a um desvio do espectro para maiores comprimentos de onda. Para uma melhor interpretação dos resultados, seria necessário o auxílio dos espectros de absorção para se conseguir tentar concluir algo sobre esta titulação.

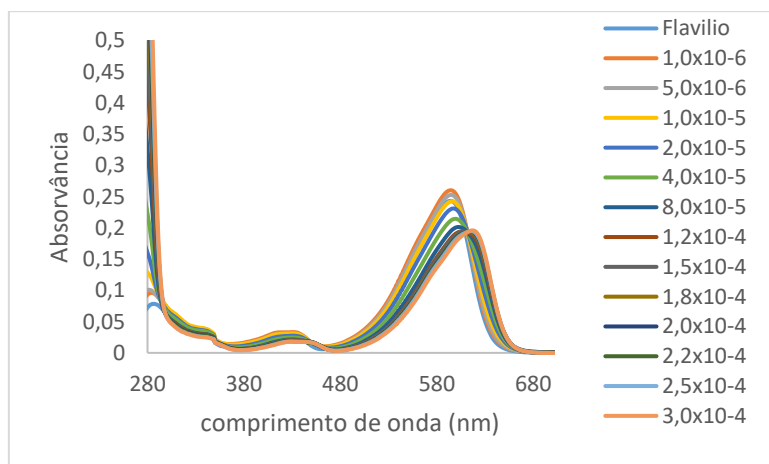
Poly (G: C):

Os resultados obtidos por absorção da titulação, indicam uma diminuição da absorvância da banda do flavílio ao longo da titulação não se verificando desvios a nível do comprimento de onda. (anexo)

#### IV.2.4- Flavílio 4:

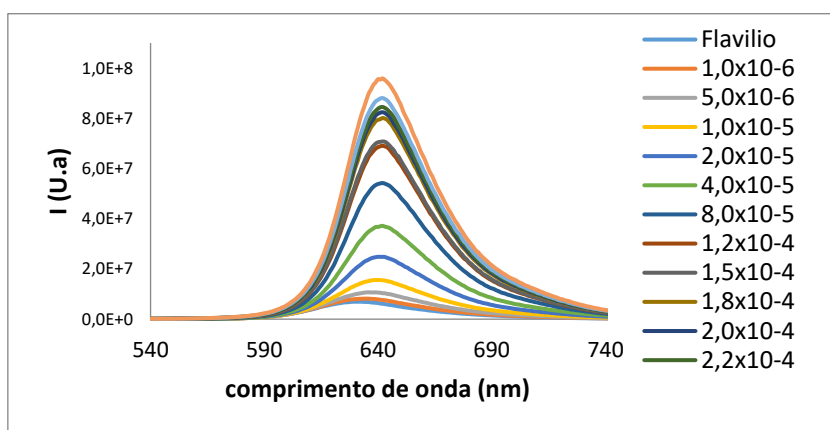
Poly (A: U):

O flavílio 4 titulado com Poly (A: U), apresenta alterações espectrais ao longo da titulação assim como desvios no comprimento de onda, indiciando que existe uma interação entre ambos- figura 53.



**Figura 53- Titulação do Flavílio 4 com Poly (A: U) por UV-Vis.**

O flavílio 4 apresenta um máximo a  $\approx 594$  nm e seguindo esse comprimento de onda ao longo da titulação, verificamos que este sofre um desvio para maiores comprimentos de onda (batocromico) à medida que a concentração de ácido nucleico aumenta. Este desvio encontra-se associado a uma diminuição gradual da absorvância, verificando-se que acima da concentração de  $1,2 \times 10^{-4}$  M dá-se uma estabilização momentânea do máximo de absorvância, seguido de um pequeno aumento da mesma (corresponde ao desvio máximo- 618 nm).



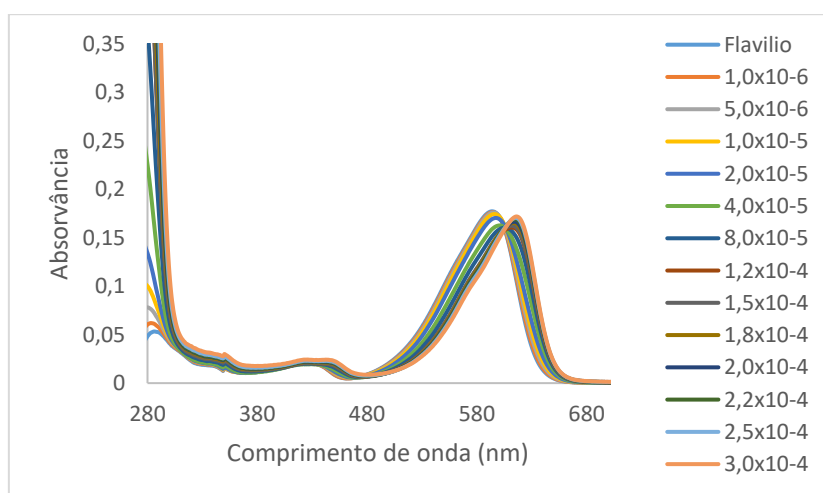
**Figura 54- Emissão da titulação do flavílio 4 com Poly (A: U).**

Os espectros de emissão (figura 54), apresentam um desvio no comprimento de onda para o vermelho ao longo da titulação, sendo este associado a um aumento abruito da intensidade de fluorescência, inicialmente, estabilizando em concentrações mais altas.

Tanto os resultados obtidos por absorção como os de emissão são bastante interessantes, devido às grandes alterações espectrais verificadas ao longo da titulação. Os desvios do comprimento de onda máximo de absorção e de emissão e as alterações verificadas nos espectros de absorção (diminuição da absorvância seguida de uma estabilização e por fim um aumento da mesma), são ilustrativos de alterações do comportamento químico do flavílio em solução com Poly (A: U), indiciando que existe uma interação entre ambos.

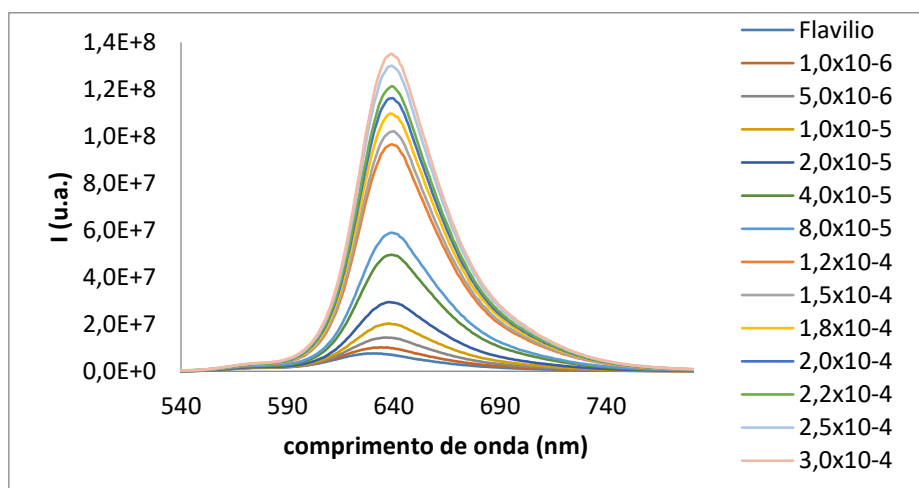
ctDNA:

O comportamento do flavílio quando titulado com ctDNA é bastante idêntico ao demonstrado quando titulado com Poly (A: U).



**Figura 55- Titulação do Flavílio 4 com ctDNA (UV-Vis.).**

Verifica-se que o flavílio ao longo da titulação (figura 55) sofre uma diminuição de absorvância gradual sendo que se destacam duas concentrações nas quais existe alteração de comportamento do flavílio:  $4 \times 10^{-5}$  M e  $8 \times 10^{-5}$  M. Observa-se que quando se aumenta a concentração de ácido nucleico de  $2 \times 10^{-5}$  M para  $4 \times 10^{-5}$  M dá-se uma alteração no comportamento do flavílio onde, entre as duas concentrações, se verifica a maior diminuição de absorvância registrada, seguindo-se de uma estabilização até à concentração  $8 \times 10^{-5}$  M observando-se um aumento da absorvância nos últimos pontos da titulação.



**Figura 56- Espectros de emissão ao longo da titulação do flavílio 4 com ctDNA.**

Os espectros de fluorescência (figura 56), tal como os obtidos na titulação com Poly (A: U), indicam um desvio do comprimento de onda máximo para maiores comprimentos de onda (628-640 nm) acoplado a um aumento de intensidade bastante elevado. Deve-se notar também que os maiores aumentos de intensidade de fluorescência ocorrem às mesmas concentrações destacadas no espectro de absorvância sendo que estas informações poderão ser representativas de alterações da estrutura do flavílio aquando em solução com ctDNA.

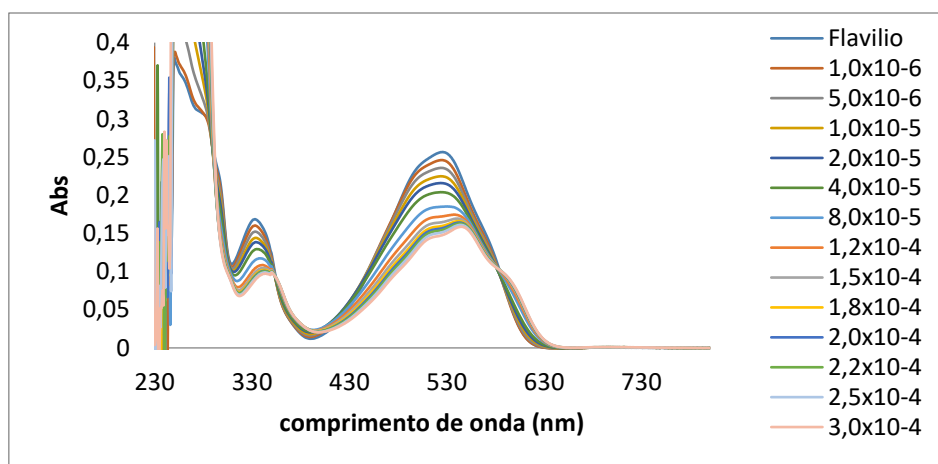
Os resultados obtidos indicam a existência de uma interação entre ctDNA e o flavílio 4, não sendo possível afirmar o tipo de interação que existe.

Não foram realizadas mais titulações para o flavílio 4 devido a problemas no manuseamento do mesmo, tais como, a estabilidade a pH=5.

#### **IV.2.5- Flavílio 5:**

Poly (A: U):

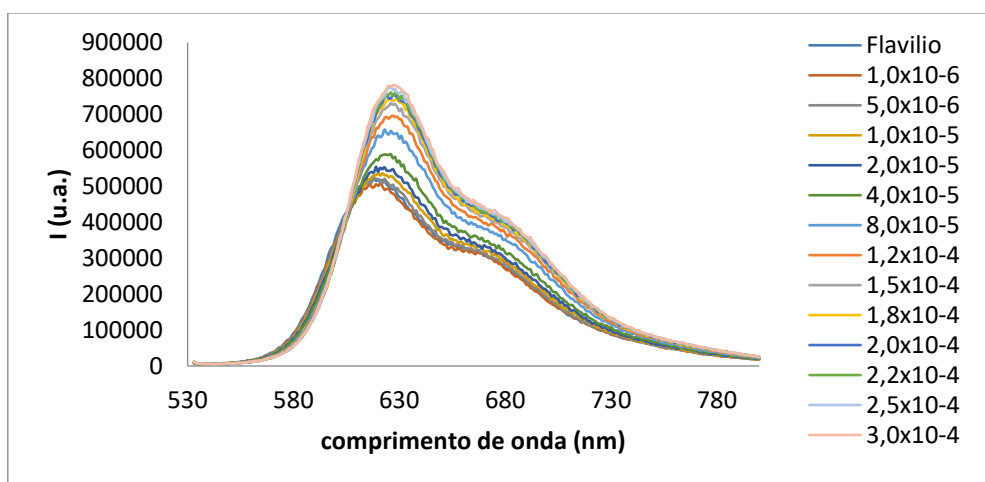
O estudo de interação entre o flavílio 5 e Poly (A: U) indicam alterações no comportamento do flavílio tanto a nível de absorção (figura 57) como de emissão (figura 57).



**Figura 57- Espectros de absorção da titulação do flavílio 5 com Poly (A: U).**

Analisando a sobreposição espectral obtida na titulação, verificamos que existe uma diminuição gradual da absorvância a 526 nm e um desvio do comprimento de onda máximo de absorção para 547 nm (desvio batocrômico).

Quando se alcançar o patamar em que se encontra em solução a concentração de  $8 \times 10^{-5}$  M de Poly (A: U), verifica-se o início da alteração da banda observada, o que indica alterações químicas estruturais do flavílio, o que indica a existência de outras espécies em solução de flavílio que podem ser derivados da interação entre o composto e o ácido nucleico.



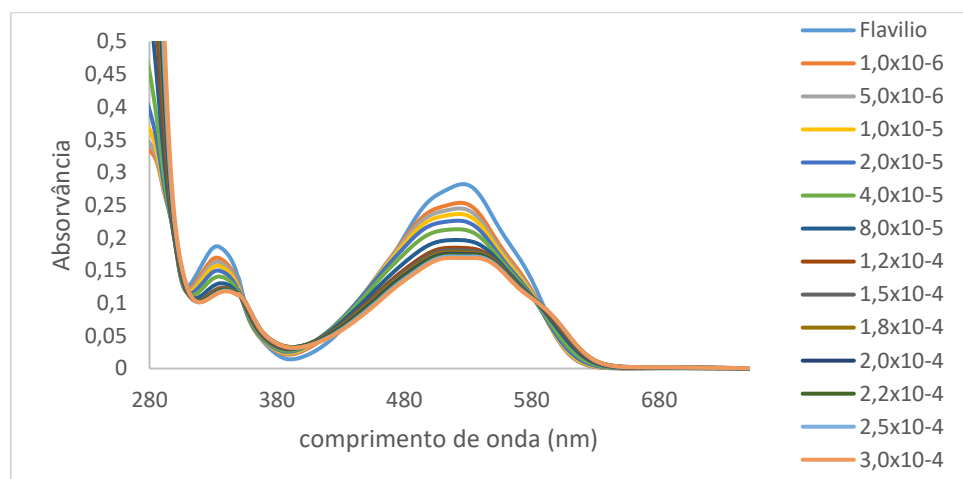
**Figura 58- Espectros de emissão ao longo da titulação Flavílio 5 com Poly (A: U).**

Nos espectros de emissão (figura 58), verifica-se um desvio gradual do comprimento de onda de máxima intensidade de fluorescência do flavílio para a região do vermelho (618-629nm), estando esta associado a um aumento da fluorescência do flavílio. Observa-se que o aumento mais abrupto de intensidade dá-se quando se verifica, pelo espectro de absorção, a formação de outras espécies do catião flavílio em solução.

Os resultados ilustrados pelos espectros de absorção e emissão indicam a possibilidade da existência de interação entre o flavílio 5 e Poly (A: U).

ctDNA:

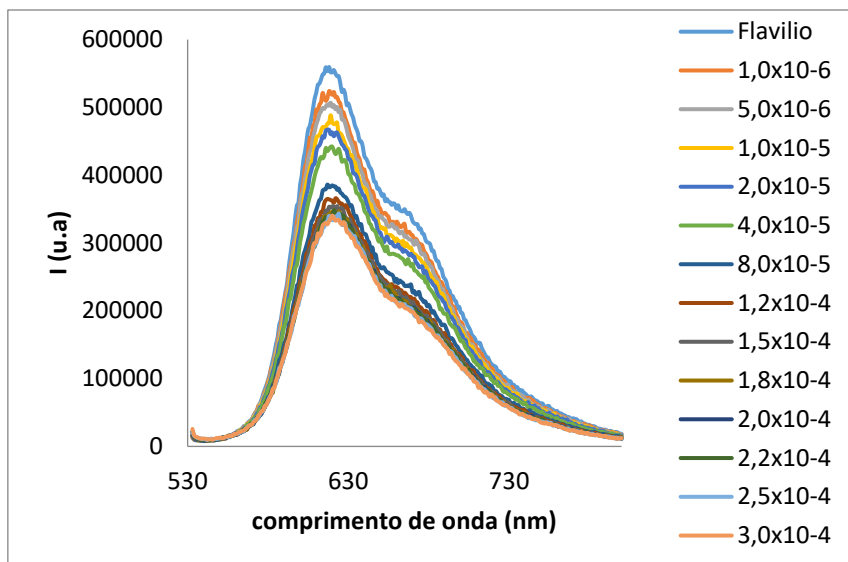
Os espectros de absorção obtidos (figura 59), indicam uma diminuição da absorvância do flavílio ao longo da titulação verificando-se alterações na banda do flavílio e estabilização da absorvância a partir da concentração  $2 \times 10^{-4}$  M, não apresentando um desvio do comprimento de onda.



**Figura 59- Sobreposição dos espectros de absorção da titulação do flavílio 5 com ctDNA.**

Os espectros de fluorescência (figura 60), indicam um comportamento diferente ao verificado na maioria das titulações realizadas. Nestes, observa-se uma diminuição da intensidade de fluorescência do flavílio ao longo da titulação, sendo o maior aumento verificado na passagem de  $4 \times 10^{-5}$  M para a concentração seguinte.

Os resultados obtidos pela titulação entre o flavílio 5 e ctDNA demonstram alterações nos espectros de emissão e absorção durante a titulação podendo ser indicativo de uma interação. Este tipo de interação, por análise do espectro de fluorescência, parece ser diferente das observadas anteriormente pois durante a titulação não se verifica um aumento da intensidade de fluorescência, mas sim uma diminuição da mesma.



**Figura 60- Espectros de emissão obtidos na titulação de ctDNA e flavílio 5.**

**Poly (A: T):**

Tal como verificado anteriormente, os espectros de emissão obtidos indicam uma diminuição da fluorescência do flavílio quando é titulado com Poly (A: T). Contudo, esta diminuição verificada não possui a mesma amplitude que a verificada na titulação com ctDNA não sendo por isso possível afirmar com todas as certezas que existe uma interação entre o flavílio e o ácido nucleico.

**Poly (G: C):**

Os espectros de absorção obtidos na titulação indicam uma diminuição gradual da absorvância da banda característica do flavílio ao longo da titulação sem se verificar qualquer desvio no comprimento de onda.

As tabelas seguintes ilustram de uma forma resumida os comportamentos observados nas titulações dos 5 flavílios com Poly (A: U) e ctDNA.

**Tabela 11- Resumo dos resultados obtidos na titulação com Poly (A: U)**

Flavílio	Desvio de $\lambda_{Abs}$ (nm)	Absorvância	Desvio de $\lambda_{Emissão}$ (nm)	Intensidade
Flavílio 1	Batocrômico	Diminui	Batocrômico	Aumenta
Flavílio 2	Batocrômico	Diminui/aumenta	Batocrômico	Diminui/Aumenta
Flavílio 3	Batocrômico	Diminui	Batocrômico	Aumenta
Flavílio 4	Batocrômico	Diminui	Hipsocrômico	Diminui
Flavílio 5	Batocrômico	Diminui	Batocrômico	Aumenta

**Tabela 12- Resumo dos resultados obtidos na titulação com ctDNA.**

Flavílio	Desvio de $\lambda_{Abs}$ (nm)	Absorvância	Desvio de $\lambda_{Emissão}$ (nm)	Intensidade
Flavílio 1	Batocrômico	Diminui	Batocrômico	Aumenta
Flavílio 2	Batocrômico	Diminui	Batocrômico	Aumenta
Flavílio 3	Batocrômico	Diminui/Aumenta	Batocrômico	Aumenta
Flavílio 4	Batocrômico	Diminui	Hipsocrômico	Diminui
Flavílio 5	-	Diminui	-	Diminui

#### IV.2.6- Constantes de associação.

**Tabela 13- Constantes de associação (K) obtidas a partir dos dados de absorção, obtidos através do ajuste de Langmuir.**

	ctDNA- K	Poly (A: U)- K
<b>Flavílio 3</b>	$8,96 \times 10^3$	$1,16 \times 10^4$
<b>Flavílio 4</b>	$1,72 \times 10^4$	$2,12 \times 10^4$
<b>Flavílio 5</b>	$1,82 \times 10^4$	$1,70 \times 10^4$

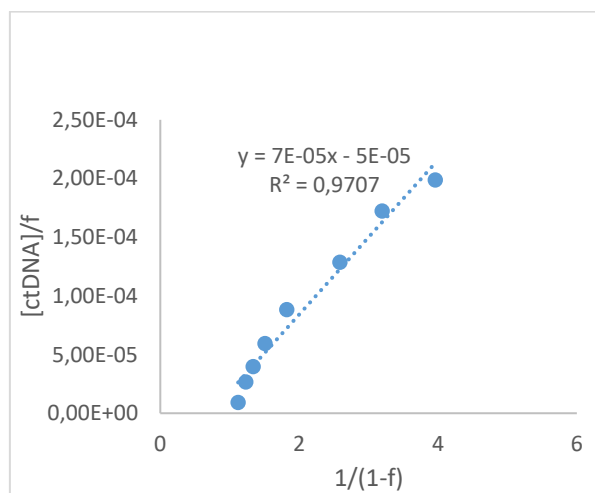
A tabela 10 demonstra os resultados obtidos pelo ajuste de *langmuir* para os flavílios 3, 4 e 5 (resultados obtidos para 1 e 2 não possuem significado qualitativo). Os resultados obtidos demonstram constantes de ligação na ordem de  $10^4$  e  $10^3$ . Apesar dos valores obtidos parecerem enquadrar-se com os encontrados na literatura, os ajustes foram realizados apenas com alguns pontos da titulação devido a este modelo ser um modelo simples para o caso em estudo. Proce- deu-se à utilização de modelos matemáticos mais complexos na procura de ajustes mais pro- missores.

**Tabela 14- Constantes de associação (K) obtidas a partir dos dados de absorção, obtidos através do ajuste de *Scatchard*.**

	ctDNA- K	Poly (A: U)- K
<b>Flavílio 1</b>	$1,15 \times 10^5$	$1,25 \times 10^5$
<b>Flavílio 2</b>	$7,51 \times 10^4$	
<b>Flavílio 3</b>	$1,43 \times 10^5$	$1,43 \times 10^5$
<b>Flavílio 4</b>	$5,00 \times 10^5$	$1,00 \times 10^6$
<b>Flavílio 5</b>	$5,00 \times 10^5$	$3,33 \times 10^5$

Utilizou-se um modelo mais complexo, mas com um erro associado maior, para verificar se seria possível proceder-se a um ajuste de todos os pontos experimentais. A tabela 11 indica os valores obtidos das constantes de associação com o modelo de *Scatchard*.

A utilização de um modelo mais complexo não revelou grandes melhorias nos ajustes aplicados. O método de *Scatchard* revelou ser de difícil aplicação e os resultados gerados não são representativos de todos os processos que ocorrem em solução, ou seja, o modelo aplicado foi aplicado apenas a alguns pontos da titulação. A figura 61 demonstra um dos ajustes aplicados pelo método até à concentração  $1,5 \times 10^{-4}$  M, verificando-se que os restantes pontos da titulação não eram ajustáveis através deste método.

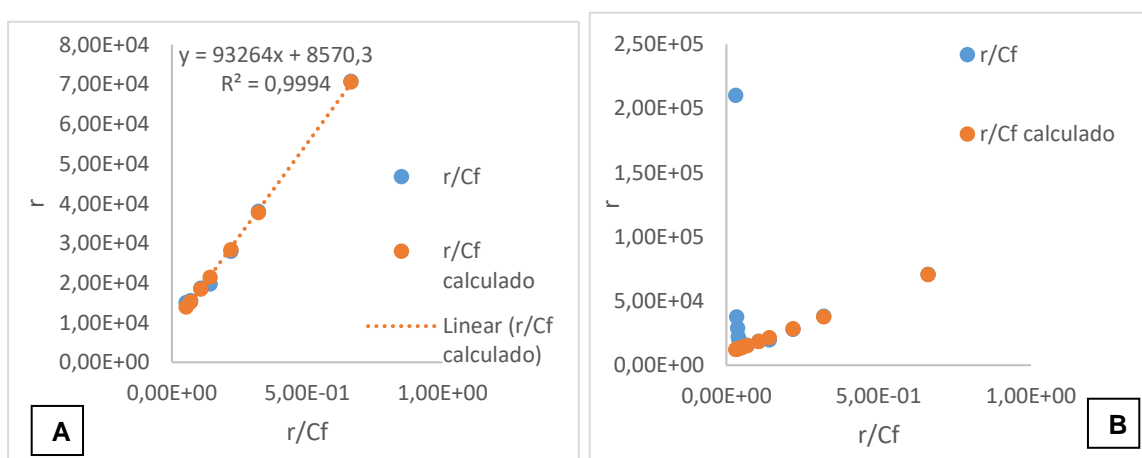


**Figura 61- Ajuste de Scatchard para o flavílio 3 com ctDNA.**



**Tabela 15- Constantes de associação (K) obtidas a partir dos dados de absorção, obtidos através do ajuste de McGhee - von Hippel.**

	ctDNA- K	Poly (A: U)- K
<b>Flavílio 1</b>	$1,88 \times 10^4$	$3,16 \times 10^4$
<b>Flavílio 2</b>		$7,51 \times 10^4$
<b>Flavílio 3</b>		$9,91 \times 10^3$
<b>Flavílio 4</b>		$8,29 \times 10^4$
<b>Flavílio 5</b>		$1,22 \times 10^4$



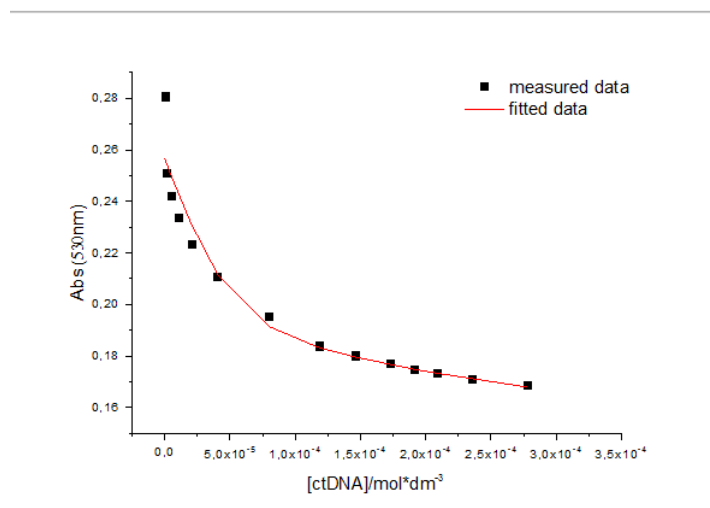
**Figura 62- Ajuste de Von Hippel Flavílio 3 com ctDNA. A) Ajuste realizado até a  $1,5 \times 10^{-4}$ . B) ajuste com todos os pontos experimentais.**

Posteriormente, realizou-se um ajuste tendo em conta o ajuste de McGhee- von Hippel mas os resultados obtidos (tabela 12 e figura 62) demonstram que a extrema dificuldade de aplicação do mesmo. Na tabela 12 demonstra que foi possível obter um valor de constante de associação do ctDNA apenas com o flavílio 1, sendo que os restantes resultados não apresentam nenhum significado quantitativo e qualitativo.

**Tabela 16- Cálculo das constantes de associação obtidos através múltiplos ajustes derivados do ajuste de Sctachard obtidos por emissão e absorção.**

	ctDNA- K	Poly (A: U)- K
<b>Flavílio 1</b>	$1,00 \times 10^4$	$5,01 \times 10^4$
<b>Flavílio 2</b>	$1,35 \times 10^4$	$5,25 \times 10^4$
<b>Flavílio 3</b>	$4,90 \times 10^5$	$4,90 \times 10^3$
<b>Flavílio 4</b>	$5,13 \times 10^4$	$1,20 \times 10^5$
<b>Flavílio 5</b>	$4,17 \times 10^5$	$4,47 \times 10^5$

Na tabela 13 encontram-se os valores de constantes de associação calculados pela parceria anteriormente enunciada. Por comparação da tabela 13 com os resultados obtidos pelos restantes ajustes matemáticos, é possível constatar que não existe nenhuma igualdade entre os valores calculados.



**Figura 63- Ajuste óbtido por ajustes derivados do método de *Scatchard*.**

Apesar dos resultados obtidos nos ajustes matemáticos não serem os melhores, os ajustes fornecidos demonstram que a utilização de derivações do método de *Scatchard* possuem um ajuste mais aproximado aos pontos experimentais, sendo que os resultados fornecidos serão os que mais próximos estarão dos reais valores de constante de associação entre os ácidos nucleicos e o flavílios estudados.

Deste modo, não foi possível obter resultados satisfatórios na utilização dos diferentes modelos, sendo impossível estabelecer um elo de comparação entre os diferentes valores de constantes de associação obtidos.

### IV.3- Estudo de interação por RMN

O estudo de interação de flavílio com ácidos nucleicos por RMN teve como intuito a detecção dos prótons do flavílio que, ao longo da titulação com a solução, podem estar relacionados com a interação com os ácidos nucleicos. As titulações com ctDNA foram otimizadas após a titulação do primeiro flavílio com ctDNA.

#### IV.3.1- Flavílio 1

Após a obtenção do espectro de  $H^+$  do flavílio 1 (anexos), procedeu-se à atribuição dos sinais obtidos de modo a poder interpretar as diferenças de intensidade obtidas ao longo da titulação. Na figura 64, encontra-se a atribuição dos desvios químicos do flavílio 1.

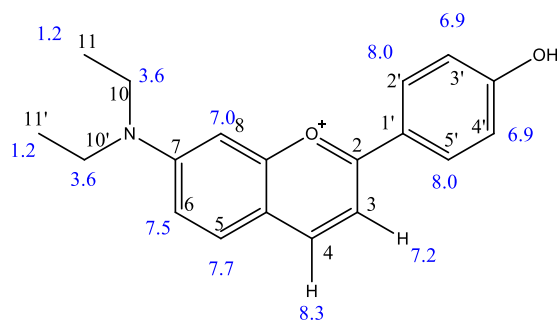
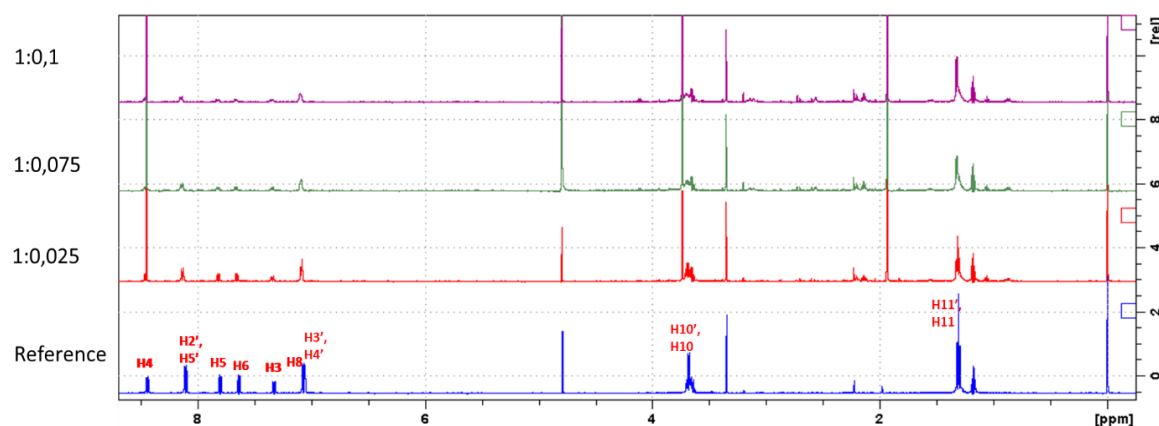


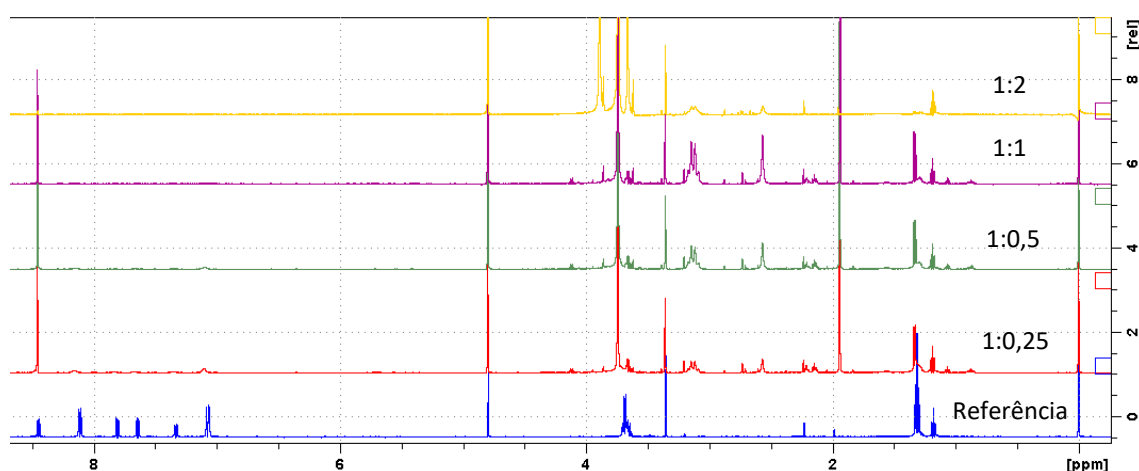
Figura 64- Estrutura do flavílio 1 e indicação dos desvios químicos dos prótons do composto.

##### IV.3.1.1- ctDNA

Por análise à atribuição de intensidades obtidas para cada próton deste flavílio é de esperar que os prótons 11/11', 10/10', 3/4' e 2'/5' apresentem-se em regiões de desvio químico muito próximos, sendo por vezes difícil de obter informação individual para cada um dos prótons.



**Figura 65- Espectros de próton da titulação do Flavílio 1 com ctDNA- pontos iniciais.**



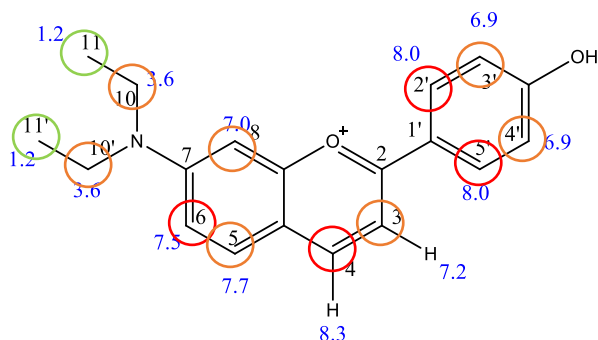
**Figura 66-Espectros de próton da titulação do Flavílio 1 com ctDNA- pontos finais.**

Os espectros de próton recolhidos ao longo da titulação, indicam que as zonas do flavílio 1 que interagem mais com o ctDNA estão localizadas na zona estrutural pertencente à forma de catião do flavílio, sendo que os locais que representa os grupos de substituição deste flavílio apresentam uma afinidade mais baixa para com o ctDNA. A figura 65, indica que os prótons dos substituintes se encontram em campo magnético alto (maior efeito de blindagem) e em permuta química muito rápida, enquanto que os prótons dos aromáticos possuem sinais em campos mais baixos (menos efeito de blindagem por parte dos prótons).

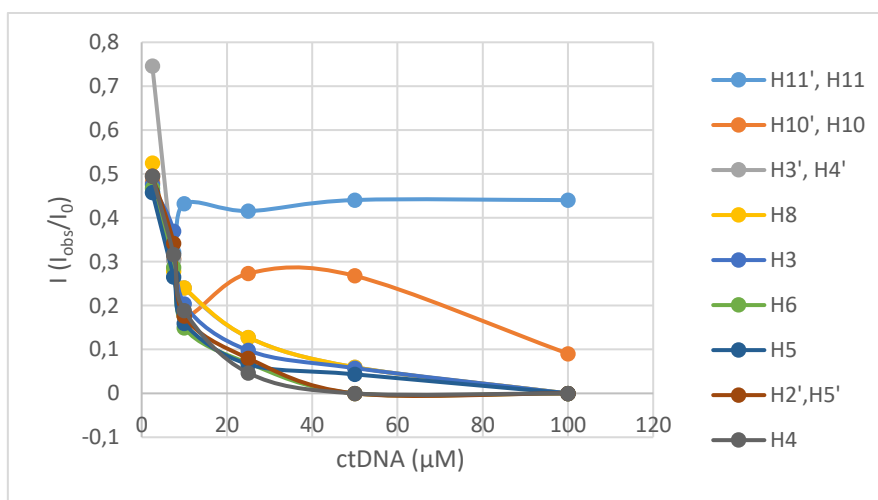
Nos primeiros pontos da titulação (figura 65), denota-se uma diminuição dos sinais do flavílio sendo que nenhum dos sinais sofre total alargamento do sinal até à concentração de 10  $\mu$ M. Quando se encontra, em solução, uma concentração de 25  $\mu$ M de ctDNA (figura

66) existe um alargamento total dos sinais de próton localizados nas posições 4, 6, 2' e 5' do flavílio, como se encontra, a vermelho, na figura 67. Os espectros da figura 65, podem parecer indicar que a 25  $\mu$ M, os sinais de próton, referentes aos prótons representados a laranja

(figura 67), já não possuem intensidade, mas através da medição das intensidades, construiu-se o gráfico (figura 68) que indica que os sinais a laranja apenas sofrem alargamento total a 50  $\mu\text{M}$ .



**Figura 67- Representação esquemática dos resultados obtidos na titulação do flavílio 1 com ctDNA. Estão localizados a vermelho os prótons que possuem uma afinidade maior para com o ácido nucleico, a laranja os que possuem uma afinidade intermédia e a verde os prótons que não interagem com o ácido nucleico.**



**Figura 68- Relação dos rácios de intensidade observados com a concentração de ctDNA ao longo da titulação.**

Os prótons 11 e 11' são visíveis ao longo de toda a titulação não se verificando total diminuição da intensidade de sinal. Esta fraca interação pode dever-se ao modo com o flavílio interage com o ctDNA (se é por intercalação nas bases ou por interação com os *grooves*) ou pode dever-se a uma maior dinâmica dessa região da molécula. Por analogia, com análise contraditória, os prótons 10 e 10' sofrem total supressão de sinal ao longo da titulação, mas o espectro indicado que estes sofrem um efeito menor de blindagem por parte da molécula encontrando-se em campos mais baixos, como enunciado no capítulo II.5.

#### IV.3.1.2- Poly (A: U)

Como referido na secção III.3, após a experiência do flavílio 1 com o ctDNA, foram adicionados pontos na titulação de modo a acompanhar a evolução da interação de um modo gradual. Os espectros obtidos encontram-se nas figuras 69 e 70.

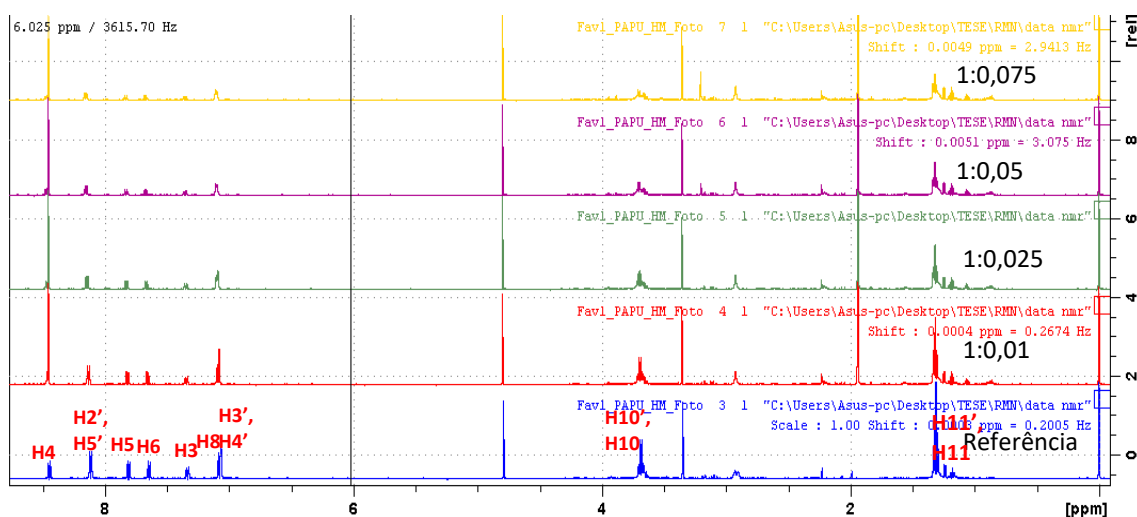


Figura 69- Espectros 1D H RMN da titulação do flavílio 1 com Poly (A: U )- pontos iniciais.

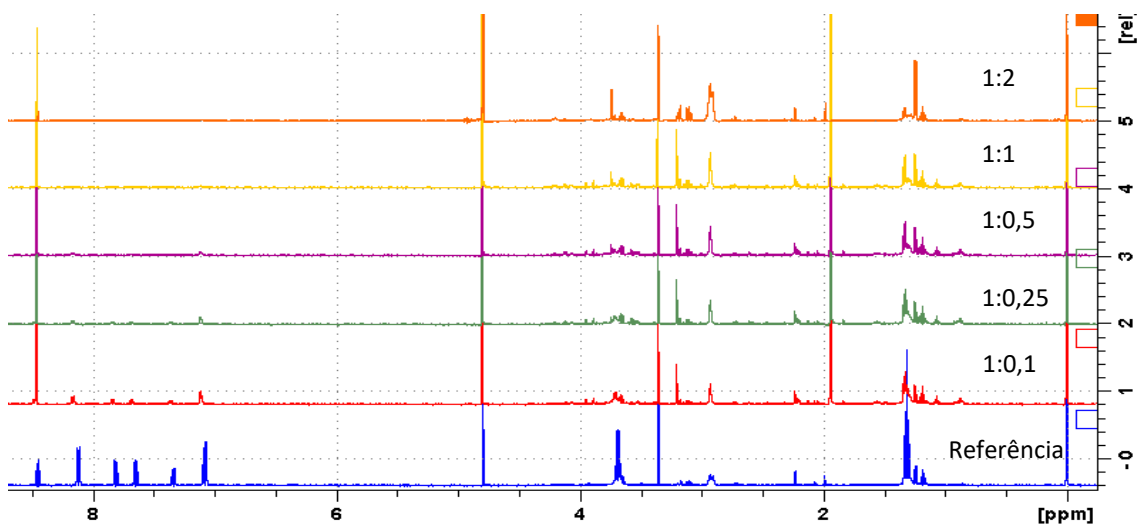
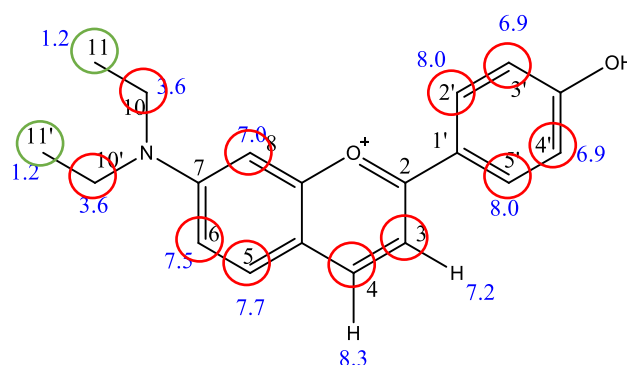
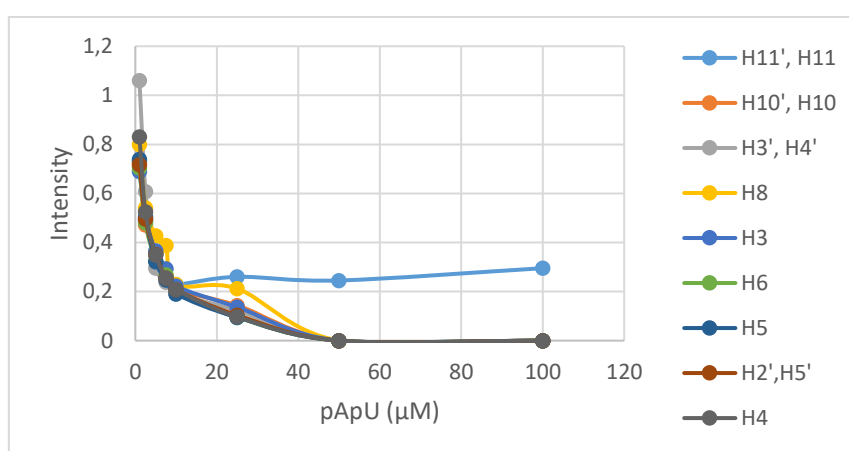


Figura 70-Espectros 1D H RMN da titulação do flavílio 1 com Poly (A: U )- pontos finais.

A partir dos espectros representados na figura 69, verifica-se a existência de um alargamento de sinal das bandas, em todos os prótons, sendo este alargamento mais perceptível nos locais correspondentes aos prótons dos aromáticos dos flavílio. O alargamento total das bandas, ou seja, a diminuição das intensidades das mesmas dá-se para todos os prótons, com exceção do 11/11', quando na solução a concentração de Poly (A: U) é de 50  $\mu$ M (representado a vermelho- figura 71). A medição das intensidades ao longo da titulação torna esta afirmação perceptível, como se encontra indicado na figura 72.



**Figura 71- Representação esquemática dos resultados obtidos na titulação do flavílio 1 com Poly (A: U). A vermelho encontram-se localizadas as regiões que interagem com Poly (A: U) e a verde as que possuem menor afinidade para com o mesmo.**



**Figura 72- Relação dos rácios de intensidade observados com a concentração de Poly (A: U) ao longo da titulação**

Observando a figura 72, denota-se uma diminuição progressiva das intensidades dos prótons (alargamento da banda), que é característica da existência de uma interação entre o flavílio 1 e o Poly (A: U). A utilização de mais concentrações no estudo de interação entre o flavílio e o Poly (A: U), possibilitou o acompanhamento mais preciso da experiência.

Em suma, comparando o comportamento do flavílio 1 com o ctDNA e Poly (A: U), este parece interagir de um modo mais rápido com o Poly (A: U), sendo que essa interação se dá primeiramente pela estrutura central do flavílio e posteriormente, concentração seguinte, é que se verifica o desaparecimento da intensidade dos prótons 10/10'. A interação com Poly (A: U) parece possuir um equilíbrio mais gradual, sendo que os prótons do flavílio (com a exceção de 11/11') parecem ter um comportamento ligeiramente diferente do que o apresentado na presença de ctDNA. Na titulação com Poly (A: U) a diminuição das intensidades é mais uniforme, significando que toda a estrutura do flavílio 1 interage de igual forma com o Poly (A: U). O diferente comportamento da diminuição das intensidades pode significar diferentes modos de interação do flavílio com os ácidos nucleicos ou diferentes afinidades para com os mesmos.

#### IV.3.2- Flavílio 2

Tal como feito no flavílio 1, após a obtenção do espectro de  $H^+$  do flavílio 2 (anexos), procedeu-se à atribuição dos sinais obtidos de modo a poder interpretar as diferenças de intensidade obtidas ao longo da titulação. Na figura 73, encontra-se a atribuição dos desvios químicos do flavílio 2.

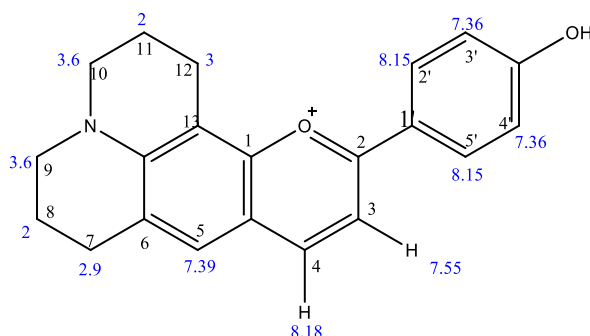


Figura 73- Estrutura do flavílio 2 e indicação dos desvios químicos dos protões do composto.

Por análise à atribuição de intensidades obtidas para cada protão deste flavílio é de esperar que os protões 9/10, 3/5' e 2'/5' apresentem-se em regiões de desvio químico muito próximos, sendo por vezes difícil de obter informação individual para cada um dos protões. Os protões 3'/4', 3, 4, 5, 2'/5' (protões localizados no esqueleto do flavílio) apresentam-se num campo magnético mais baixo do que os restantes sendo que sofrem um menor efeito de blindagem. O efeito de blindagem deve-se à rigidificação da amina e das ressonâncias existentes entre os grupos aromáticos da molécula.

##### IV.3.2.1- ctDNA

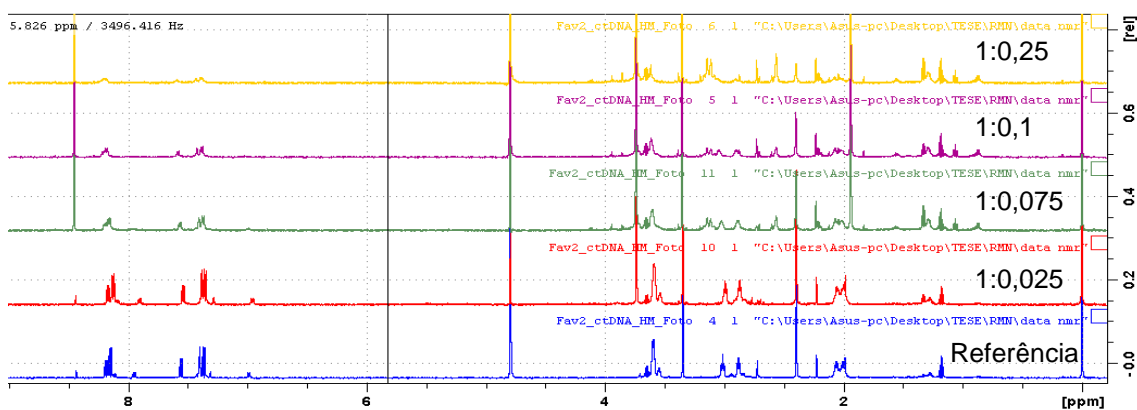
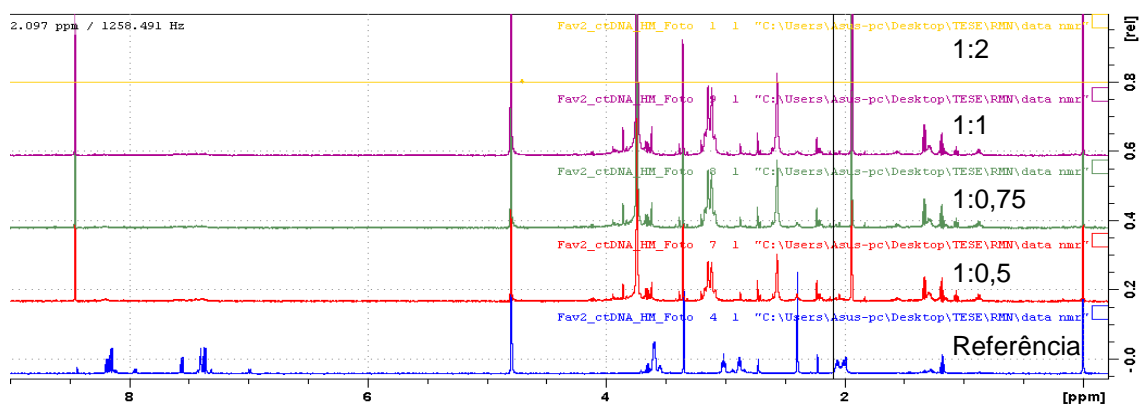


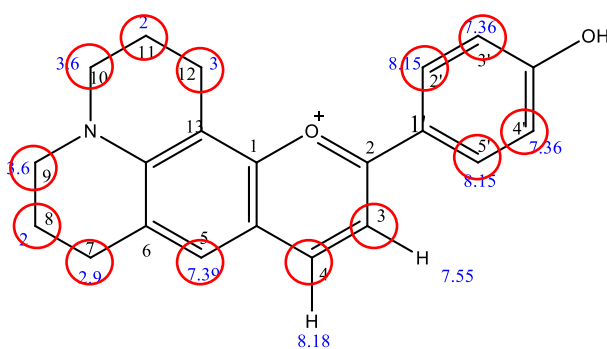
Figura 74-Espetros 1D  $H$  RMN da titulação do flavílio 2 com ctDNA- pontos finais.



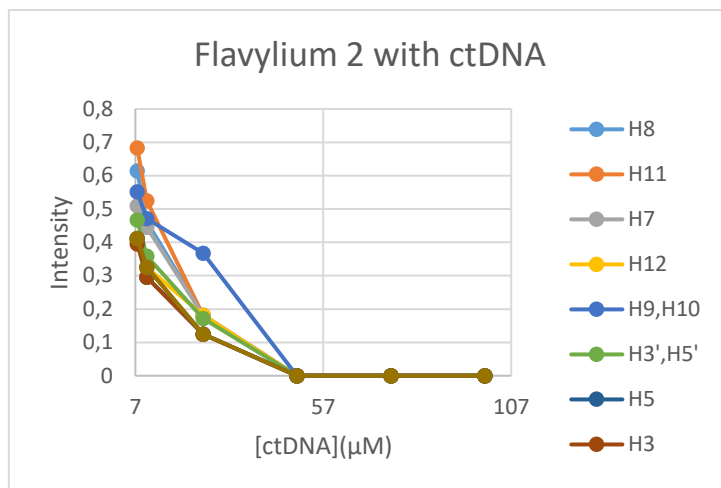


**Figura 75- Espetros 1D H RMN da titulação do flavílio 2 com ctDNA- pontos finais.**

Com base nas figuras 74 e 75, é perceptível que o flavílio 2 ao ser titulado com ctDNA possui uma diminuição das intensidades/ largura de banda ao longo da titulação e todos os prótons, sendo este, nos pontos iniciais, mais evidente nos prótons que possuem menor blindagem. Quando na solução em estudo chegamos à concentração de 50  $\mu\text{M}$  (figura 75), verifica-se uma diminuição das intensidades de todos os prótons. Por comparação da diminuição das intensidades ao longo da titulação, entre flavílio 1 e 2, verifica-se no flavílio 1 o decréscimo das mesmas é muito acentuado no início, ao passo que o flavílio 2 apresenta uma diminuição das intensidades mais gradual ao longo da titulação e exposto que todos os prótons deste parecem interagir de igual modo com a molécula de ctDNA, o que não acontecia com o flavílio anterior. A figura da molécula, demonstra (a vermelho) os prótons responsáveis pela interação entre flavílio 2 e ctDNA. Os prótons 10 e 9, apresentam um comportamento, a nível de intensidades, ligeiramente diferente dos outros prótons (figura 77) sendo que a sua diminuição se torna maior a partir da concentração de 30  $\mu\text{M}$  de ctDNA.



**Figura 76- Representação esquemática dos resultados obtidos na titulação do flavílio 2 com ctDNA. A vermelho encontram-se localizadas as regiões que possuem afinidade com o ácido nucleico.**

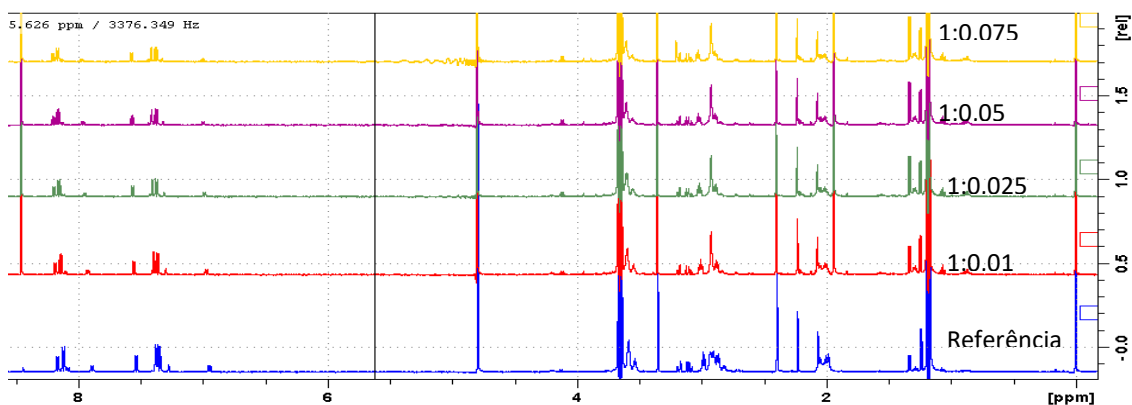


**Figura 77- Rácios das intensidades dos diferentes prótons ao longo da titulação do flavílio 2 com ctDNA.**

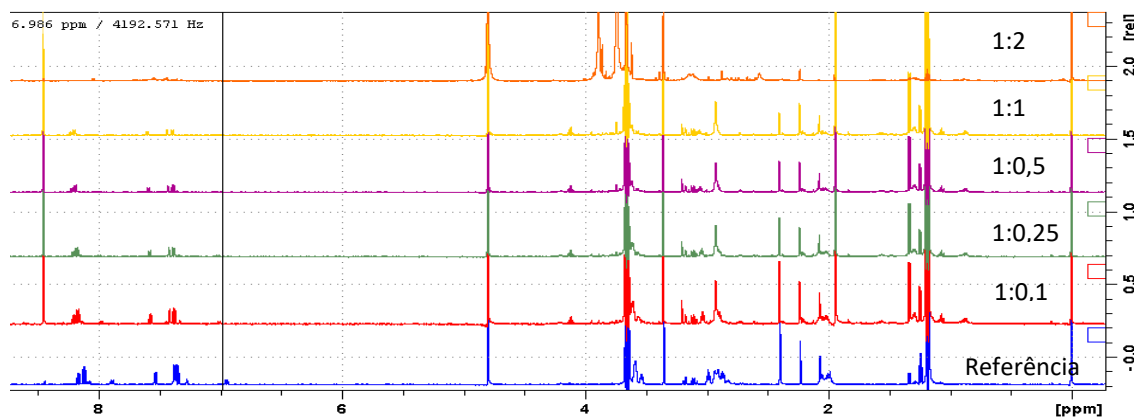
O comportamento demonstrado pela titulação do flavílio poderá ser indicio de um comportamento de intercalação entre bases, mas não é possível aferir a veracidade deste mesmo comportamento apenas com as experiências realizadas.

#### IV.3.2.2- Poly (A: U)

O estudo de interação entre o Poly (A: U), demonstrou um comportamento do mesmo muito diferente do registado anteriormente- figuras 78 e 79.

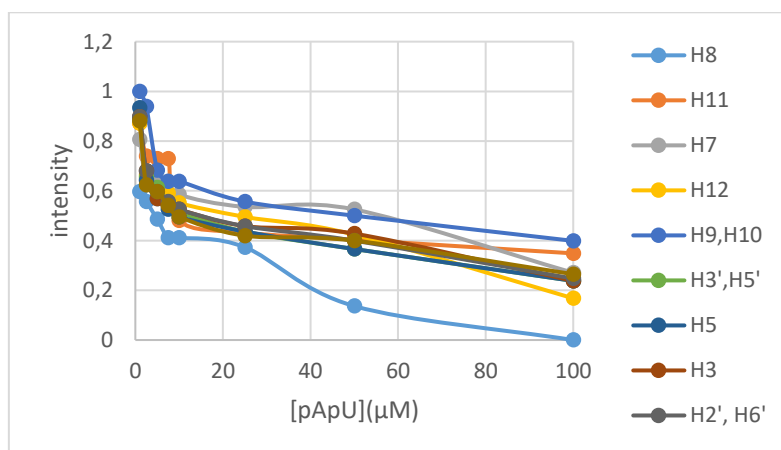


**Figura 78- Espetros 1D H RMN da titulação do flavílio 2 com Poly (A: U )- pontos iniciais.**



**Figura 79- Espectros 1D H RMN da titulação do flavílio 2 com Poly (A: U) - pontos finais.**

A titulação (figuras 78 e 79) demonstra um comportamento completamente contraditório ao registrado com o ctDNA. Ao longo da titulação observa-se uma diminuição das intensidades das bandas / alargamento das bandas que é gradual e não é total ao longo da titulação verificando-se que na solução em que existe a proporção 1:2 (flavílio: Poly (A: U)), este continua a apresentar intensidades em quase todos os prótons, apesar da diminuição das mesmas. Deste modo, e comparando com os resultados obtidos na titulação do Flavílio 1 com Poly (A: U), o flavílio 2 parece apresentar uma afinidade bastante baixa para com o ácido nucleico e, por observação dos resultados obtidos nas titulações de flavílio 2 com ctDNA e Poly (A: U), a sua afinidade parece ser bastante maior para as bases do DNA do que para as bases de uracilo e adenina e tal pode explicar as diferenças tão discrepantes observadas.



**Figura 80- Rácios das intensidades dos diferentes prótons ao longo da titulação do flavílio 2 com Poly (A: U).**

Por análise da figura 80, é possível constatar essa fraca afinidade entre o flavílio e o Poly (A: U). Apesar da baixa afinidade deve-se denotar que o flavílio aquando titulado com o ácido nucleico possui diminuição das intensidades dos prótons e isso é indicio de uma interação, que neste caso pode ser fraca, ou trata-se de uma interação bastante lenta com o ácido nucleico visto que que na proporção 1:2 ainda se verificam intensidades dos prótons do flavílio. Neste

caso, e ao contrário do que se visualizou nas experiências deste flavílio com ctDNA, o grupo de substituição torna a molécula mais rígida e, considerando que existe uma interação por mais fraca que seja, dificulta a interação entre o flavílio e o Poly (A: U), como se de um impedimento estereoquímico se tratasse.

Comparando os tipos de interação visualizados para ambos os flavílios com os dois ácidos nucleicos, estes parecem ter tendências distintas, o flavílio 1 possui uma maior afinidade pelo Poly (A: U) enquanto que o flavílio 2 parece possuir uma maior afinidade para o ctDNA. Os dois flavílios apresentam grande semelhança estrutural diferenciando apenas no estado em que a amina se encontra na molécula parecendo que esta é responsável pelo tipo de afinidade que a molécula demonstra, ou seja, as propriedades do grupo de substituição parecem gerar diferentes tipos de afinidade com ácidos nucleicos uma vez que as zonas do esqueleto dos flavílios possui um comportamento contínuo e são equivalentes (com a exceção do flavílio 2 com o Poly (A: U), estes demonstram interação).

Todas as experiências realizadas apresentam *shifts* nos desvios químicos ao longo da titulação, sendo que, estes indicam mudanças no ambiente químico da molécula o que pode ser mais um indicativo de interação.

### IV.3.3- Competição

A experiência de competição tinha como intuito observar as diferenças entre os flavílios aquando em solução juntos e com um dos ácidos nucleicos. Os resultados das titulações na experiência de competição estão apresentados na tabela seguinte.

**Tabela 17- Intensidades registadas na experiência de competição com ctDNA- Flavílio 1.**

[ctDNA] ( $\mu$ M)	H11', H11	H10', H10	H3', H4'	H8	H3	H6	H5	H2', H5'	H4
2,5	0,602	0,723	0,7445	0,6752	0,7666	0,7021	0,6368	0,6752	0,6752
10	0,506	0,5514	0,4581	0,3162	0,4321	0,4035	0,2758	0,3452	0,301

**Tabela 18- Intensidades registadas na experiência de competição com ctDNA- Flavílio 2.**

[ctDNA] ( $\mu$ M)	H8	H11	H7	H12	H9, H10	H3', H5'	H5	H3	H2', H6'	H4
2,5	0,8809	0,8809	0,9159	0,717	0,8534	0,8208	0,7893	0,6065	0,709	0,7021
10	0,8789	0,6446	0,7247	0,4493	0,6509	0,4763	0,3996	0,2758	0,4237	0,3732

Por observação das tabelas 17 e 18 e comparando com os resultados obtidos, os resultados apresentados na experiência de competições nos dois pontos enunciados apresenta alguma concordância com o discutido. O flavílio 1 atinge rapidamente o equilíbrio na interação com o ctDNA, demonstrando essa mesma interação com os valores de intensidade a diminuírem mais rápido do que os do flavílio 2.

Através da comparação dos resultados obtidos com os obtidos na titulação feita na seção anterior (flavílio 2), verifica-se que este possui uma afinidade mais alta para com o ctDNA mas uma cinética mais lenta, sendo que apenas se visualiza a sua interação total com o ácido nucleico a 50  $\mu$ M.

A experiência de competição com o Poly (A: U) apresenta muitos erros associados, não sendo conclusivo o estudo. As tabelas referentes à experiência de competição entre Poly (A: U) pode ser consultada em anexo, mas não é possível interpretar com coerência os dados obtidos.

#### IV.4- Tempos de Vida

Como referido na seção (parte experimental), apenas foram medidos os tempos de vida para todos os flavílios utilizando Poly (A: U) e ctDNA. Nas experiências realizadas, alguns resultados possuem baixa qualidade, representado pelo valor de  $\chi^2$ , onde estes se apresentam longe da unidade quer se utilize um tratamento mono ou bi-exponencial.

Devido ao problema obtido em alguns dos resultados obtidos, deveria ter-se procedido a uma reavaliação dos decaimentos de modo a impor um tempo de vida correspondente ao do flavílio livre e deixando um segundo tempo ajustar-se livremente e recuperar o tempo de vida do flavílio em solução com ácido nucleico, por exemplo.

Na obtenção dos tempos de vida, o tempo de vida do flavílio foi, por vezes, difícil de obter e tal poderá estar relacionado com a resolução temporal do equipamento utilizado. Todos os ensaios foram feitos em triplicado, estando representados pela média dos resultados obtidos. Só foram adquiridos tempos de vida com Poly (A: U) e ctDNA devido a problemas com o aparelho de análise.

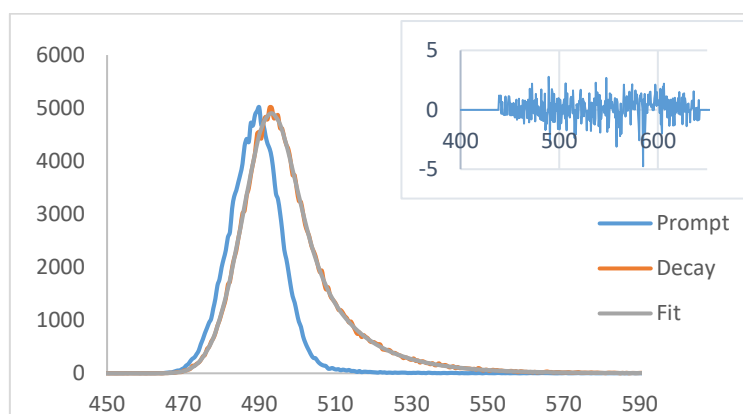
##### IV.4.1- Flavílio 1:

A tabela 19 representa os valores de tempo de vida obtidos do flavílio e do flavílio titulado com Poly (A: U). Estes foram ajustados como mono-exponencias (no caso do flavílio sozinho) ou bi-exponenciais (quando titulado).

**Tabela 19- Tempos de vida do Flavílio 1 na ausência/presença de Poly (A: U).**

[Poly (A: U)] ( $\mu\text{M}$ )	B <sub>1</sub>	$\tau_1$ (ps)	B <sub>2</sub>	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		277			0,92
40	0,25	260	0,004	1204	0,75
120	0,10	367	0,037	1323	1,07
300	0,06	768	0,028	1675	1,14

Observando a tabela 19, considerando que o tempo de vida do flavílio é 277 ps, é possível constatar que à medida que é adicionado ácido nucleico à solução, o tempo de vida parece aumentar. Apesar dos valores de  $\chi^2$  não serem todos perto da unidade, o aumento do tempo de vida é cerca de 10 vezes superior ao do tempo de vida do flavílio sem qualquer ácido nucleico titulado. Por exemplo, o tempo de vida, quando exposto a uma concentração de 120  $\mu\text{M}$  de Poly (A: U),  $\chi^2$  próximo de 1, o tempo de vida do flavílio sobre um aumento bastante significativo (277 ps para 1323 ps).



**Figura 81- Decaimentos observados do (*prompt*), do flávilio com 120  $\mu\text{M}$  de Poly (A: U) (*Decay*), o ajuste (*fit*) e resíduos (canto superior direito)**

A Figura 81 demonstra esse mesmo efeito exposto na tabela 19. Observando o decaimento, é visível um desvio entre o decaimento do pico do LED (*prompt*- fonte de excitação) e o decaimento com 120  $\mu\text{M}$  de Poly (A: U). Comparando os resultados obtidos pela medição de tempos de vida, onde há um aumento quando presente Poly (A: U) em solução, que existe algum tipo de interação entre o Flavílio 1 e Poly (A: U).

**Tabela 20- Tempos de vida do Flavílio 1 na ausência/presença de ctDNA.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		289			1,15
40	0,25	255	0,009	639	1,07
120	0,16	346	0,013	1124	1,12
300	0,13	432	0,014	1427	1,17

Os tempos de vida (tabela 20) demonstram que o flavílio 1 também apresenta um aumento significativo na presença de ctDNA em solução. Como é possível observar, o tempo de vida do flavílio obtido é superior ao que foi obtido na titulação com Poly (A: U). Deste modo, para futuras comparações, consideramos o tempo de vida do flavílio 1 como uma média aproximada dos ajustes obtidos para o flavílio nas tabelas 19 e 20, o tempo de vida do flavílio é cerca de 280 ps. Com recurso há tabela 20, observa-se um aumento do tempo de vida do flavílio quando se encontra em solução com ctDNA mas sendo este aumento inferior ao obtido na presença de Poly (A: U). Por comparação dos valores obtidos é intuito dizer que o flavílio 1 possui uma interação maior com Poly (A: U) do que ctDNA mas tal não é possível constatar apenas com os valores de tempo de vida obtidos pois estes possuem vários erros associados.

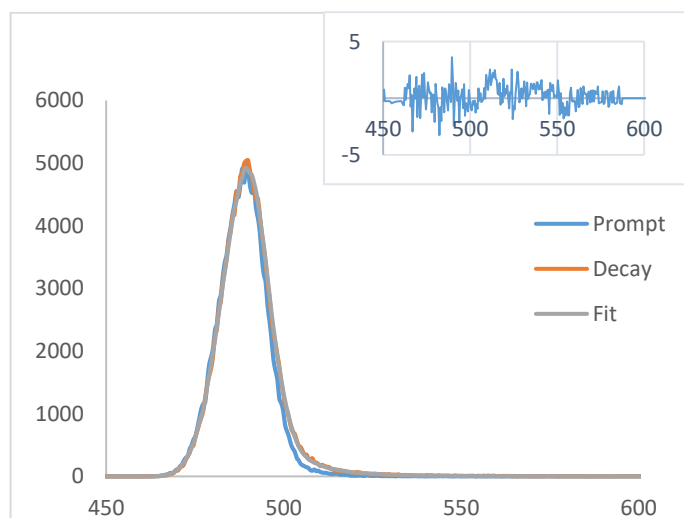
#### IV.4.2- Flavílio 2:

A tabela 21 apresenta os tempos de vida do flavílio 2 com e sem Poly (A: U) em solução.

**Tabela 21- Tempos de vida do Flavílio 2 na ausência/presença de Poly (A: U).**

[Poly (A: U)] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		164			0,99
40	0,93	87	0,002	808	0,83
120	0,53	129	0,004	1290	0,99
300	1,08	88	0,005	956	0,99

Por análise dos valores obtidos, constata-se que o flavílio 2 tem um tempo de vida de 164 ps e que este, na presença de Poly (A: U), sofre um aumento significativo ao longo da titulação com exceção aquando a solução de flavílio se encontra titulada com 120  $\mu\text{M}$  (figura 82). Este decrescimento de tempo de vida máximo pode dever-se ao aparelho onde foram adquiridos os dados, pois se repararmos no valor de  $\tau_1$  da concentração 120  $\mu\text{M}$ , este tem um valor muito inferior ao obtido quando apenas se encontra o flavílio em solução, ou seja, o processamento dos tempos de vida ao longo das diferentes concentrações de Poly (A: U) revelam oscilações relevantes nos parâmetros de análise dificultando a comparação dos resultados obtidos. Olhando para os valores de  $\tau_1$  obtidos ao longo da experiência, estes apresentam um valor inferior ao obtido na experiência onde não estava Poly (A: U) presente. Apesar da maioria dos valores apresentarem um valor de  $\chi^2$  próximo de 1, a interação entre o ácido nucleico e o flavílio poderá possuir valores de tempo de vida superiores, caso seja considerado que o tempo de vida do flavílio seja de 164 ps. Deste modo e para a obtenção de melhores resultados, seria interessante num próximo trabalho, realizar-se um ajuste fixando  $\tau_1$  ao tempo de vida do flavílio para observar alterações no  $\tau_2$  ao longo da titulação.



**Figura 82- Decaimentos observados do flavílio na ausência/ presença de Poly (A: U) (120  $\mu\text{M}$ ).**



**Tabela 22- Tempos de vida do Flavílio 2 na ausência/presença de ctDNA.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
<b>0</b>		148			1,13
<b>40</b>	0,90	98	0,011	689	0,94
<b>120</b>	1,27	41	0,048	828	1,03
<b>300</b>	0,59	120	0,039	1190	1,16

Considerando que o tempo de vida do flavílio 2 na ausência de ácido nucleico é de 164 ps, observa-se que ao longo da titulação o tempo de vida do flavílio aumenta gradualmente com o aumento da concentração (tabela 22). O aumento observado dos tempos a 40 e 120  $\mu\text{M}$ , das duas tabelas, indicam que o flavílio 2 poderá possuir uma maior interação ou afinidade para com Poly (A: U), pois o aumento do tempo de vida entre essas duas concentrações é bastante mais significativo, sendo que seriam fazer uma repetição da experiência para validar alguns dos valores obtidos devido aos valores de  $\chi^2$  na experiência com o ctDNA não serem os melhores.

#### IV.4.3- Flavílio 3:

Os valores obtidos na titulação do flavílio 3 com Poly (A: U) estão descritos na tabela 23.

**Tabela 23- Tempos de vida do Flavílio 3 na ausência/presença de Poly (A: U).**

[Poly (A: U)] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
<b>0</b>		200			0,70
<b>40</b>	0,97	207	0,035	914	0,61
<b>120</b>	0,91	233	0,087	921	0,65
<b>300</b>	0,87	390	0,127	1126	0,75

Por análise dos valores obtidos, estes apresentam valores de  $\chi^2$  pouco próximos da unidade, sendo que a sua veracidade poderá ser questionável devido à dificuldade do ajuste. Apesar deste fator e com recurso aos resultados obtidos nas titulações, onde se verifica alterações espectroscópicas do flavílio aquando na presença de Poly (A: U), que o tempo de vida do flavílio provavelmente apresenta um aumento do tempo de vida na presença das diferentes concentrações de ácido nucleico. Os dados obtidos demonstram tal afirmação, mas, como dito anteriormente, estes não podem ser confirmados pois os ajustes feitos aos dados obtidos apresentam-se longe do desejado.

**Tabela 24- Tempos de vida do Flavílio 3 na ausência/presença de ctDNA.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
<b>0</b>		199			0,64
<b>40</b>	0,379	162	0,008	695	0,65
<b>120</b>	0,457	134	0,015	695	0,60
<b>300</b>	0,374	160	0,014	772	0,59

O mesmo se sucede com os resultados obtidos para o flavílio na presença de ctDNA (tabela 24). Os valores de  $\chi^2$  encontram-se valores muito longe da unidade e tal afeta os tempos de vida obtidos, por exemplo, observando as concentrações 0 e 120  $\mu\text{M}$ , o tempo de vida do flavílio sobre um aumento para 695 ps sendo que posteriormente atinge os 772 ps a 300  $\mu\text{M}$ . Os resultados obtidos na titulação com ctDNA demonstram uma alteração no comportamento do flavílio ao longo da titulação, mas tal não pode ser aferido com base nos tempos de vida obtidos processados com duas exponenciais.

Pelos valores obtidos, tanto para a titulação com Poly (A: U) e ctDNA, ponderou-se se estes possuiriam valores de  $\chi^2$  muito desviados devido ao processamento utilizado. A tabela seguinte ilustra esses mesmo valores.

**Tabela 25- Tempos de vida do Flavílio 3 na ausência/presença de ctDNA com ajuste mono-exponencial.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	$\tau_1$ (ps)	$\chi^2$
<b>0</b>	200	0,70
<b>40</b>	254	0,94
<b>120</b>	322	1,30
<b>300</b>	350	1,54

A tabela 25 demonstra que o ajuste para uma mono-exponencial continua a gerar valores de  $\chi^2$  longe da unidade sendo assinalável que todos aumentaram em comparação ao ajuste bi-exponencial. Apesar de os valores continuarem a não ser muito relevantes, os resultados obtidos para a concentração de 40  $\mu\text{M}$  apresentam um valor de  $\chi^2$  próximo de um, mas o valor obtido para o tempo de vida não se parece enquadrar com o padrão de resultados que se tem obtido ao longo das experiências, sendo expetável que este sofra um aumento mais considerável após os 40  $\mu\text{M}$  de ctDNA.

#### IV.4.4- Flavílio 4:

Os tempos de vida do Flavílio 4 na presença e ausência de ácidos nucleicos estão descritos nas tabelas 26 e 27.

**Tabela 26- Tempos de vida do Flavílio 4 na ausência/presença de Poly (A: U).**

[Poly (A: U)] ( $\mu\text{M}$ )	B <sub>1</sub>	$\tau_1$ (ps)	B <sub>2</sub>	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		172			1,75
40	0,82	179	0,185	3860	0,99
120	0,39	385	0,608	3986	1,01
300	0,13	1070	0,866	4086	0,97

**Tabela 27- Tempos de vida do Flavílio 4 na ausência/presença de ctDNA.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	B <sub>1</sub>	$\tau_1$ (ps)	B <sub>2</sub>	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		172			1,75
40	0,817	221	0,183	4150	0,96
120	0,358	486	0,642	4286	1,04
300	0,297	488	0,703	4333	1,01

Nos resultados obtidos nos tempos de vida, tanto na tabela 26 como na 27, observa-se um tempo de vida do flavílio de 172 ps, na ausência de ácidos nucleicos, mas ambas apresentam um valor de  $\chi^2$  de 1,75. Deste modo não é possível definir o verdadeiro tempo de vida do mesmo.

Na presença de Poly (A: U), o tempo de vida do flavílio parece sofrer um grande aumento na presença do ácido nucleico. Quando titulado com 40  $\mu\text{M}$  este sofre um aumento muito grande sendo que nas concentrações seguintes esse aumento não seja tão drástico, isto tendo em conta que o tempo de vida do flavílio é de 172 ps não sendo a comparação feita de todo verídica. Se compararmos este possível aumento, bastante elevado, de tempos de vida do flavílio aquando titulado com ácidos nucleicos com os resultados obtidos por espectroscopia UV-VIS e fluorescência, a variação espectral associada a mudanças bastante altas nos tempos de vida do flavílio, poderá ser um indicativo de que este poderá sofrer alterações no seu meio químico aquando da interação com Poly (A: U).

Em relação ao ctDNA, observa-se que o flavílio apresenta o mesmo comportamento que apresentou aquando titulado com Poly (A: U) sendo que possivelmente o tempo de vida do flavílio na presença de ctDNA seja superior ao apresentado na presença com Poly (A: U). Comparando

os tempos de vida obtidos na presença de ctDNA em solução com os espectros obtidos, é possível que o flavílio na presença de ctDNA também sofra alteração no seu ambiente químico, pois o comportamento demonstrado nas titulações feitas por UV-Vis é ilustrativo disso.

#### IV.4.5- Flavílio 5:

**Tabela 28- Tempos de vida do Flavílio 5 na ausência/presença de Poly (A: U).**

[Poly (A: U)] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0		122			0,67
40	1,379	53	0,106	177	2,65
120	0,342	189	0,004	835	0,59
300	0,246	256	0,002	1377	0,58

**Tabela 29- Tempos de vida do Flavílio 5 na ausência/presença de ctDNA.**

[ctDNA] ( $\mu\text{M}$ )	$B_1$	$\tau_1$ (ps)	$B_2$	$\tau_2$ (ps)	$\chi^2$
0*		124			0,69
40**					
120*	1,109	53	0,137	172	0,77
300*	1,679	48	0,074	168	0,96

Os valores de tempos de vida obtidos para o flavílio 5 são menos conclusivos (tabela 28 e 29). Estes apresentam valores que não são representativos de conclusões devido aos valores de  $\chi^2$  obtidos como valores que não são passíveis de ser tratados, tais como valores de tempos de vida negativos, como é o caso de concentração 40  $\mu\text{M}$  de ctDNA. Estes resultados obtidos, assim como os menos conseguidos para os outros flavílios pode ter sido devido a problemas do instrumento.

#### IV.5- Estudo da estabilidade de ácidos nucleicos na presença de Flavílios.

No estudo da estabilidade de ácidos nucleicos com flavílios, recorreu-se às temperaturas de melting dos ácidos nucleicos de modo a observar se esta se alterava na presença dos flavílios. A monitorização da temperatura de *melting* dos ácidos nucleicos dá-se ao comprimento de onda de 260 nm devido a ser este ao qual as bases azotadas absorvem a radiação e, como o estudo incide sobre a estabilidade dos ácidos nucleicos na presença de flavílios, este é o comprimento de onda de interesse.

Após da recolha das absorvâncias a 260 nm procedeu-se ao tratamento dos dados sendo possível apresentar um ajuste dos resultados obtidos.

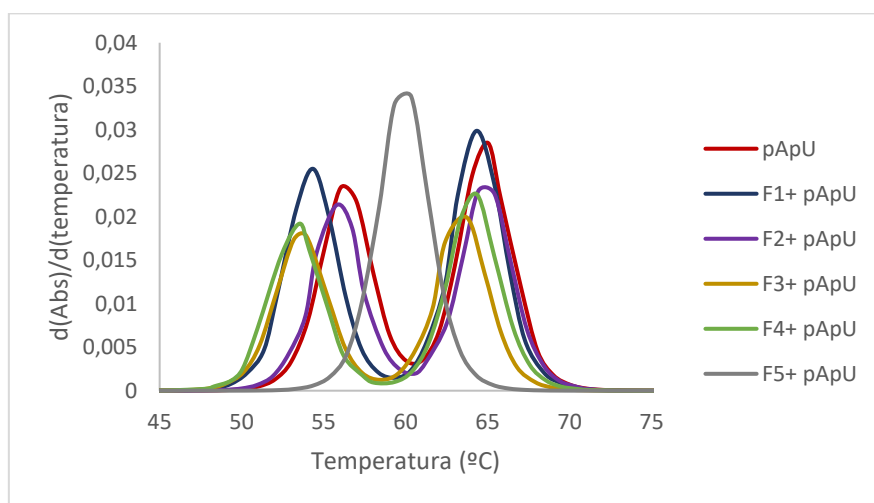


Figura 83- Ajustes obtidos através da análise dos resultados obtidos nas medições de temperatura de *melting*.

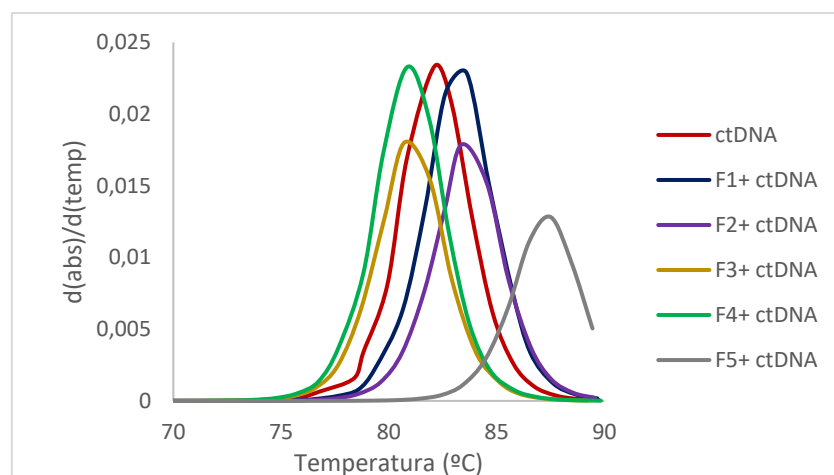
Os resultados obtidos (figura 83), demonstram que cada flavílio possui um comportamento distinto com Poly (A: U). O ácido nucleico possui duas temperaturas de *melting* devido à sua composição (dupla cadeia de dsRNA de adeninas e uracilos) sendo o primeiro ponto da temperatura de *melting* é significa que 25% da cadeia de RNA se encontra desnaturada e 75% não, sendo que na segunda  $T_m$  verifica-se que 50% da cadeia está desnaturada e 50% encontra-se na forma de dupla cadeia. Posto isto e analisando a figura 83, verifica-se que o Poly (A: U), possui dois pontos de destaque- 56° e 65° C.

Realizando uma comparação entre os pontos acima assinalados e os resultados obtidos aquando em solução se encontra o ácido nucleico e o composto flavílio, verifica-se:

- 1) No caso do flavílio 1, existe uma diminuição do primeiro ponto de  $T_m$  (56-54°C) e no segundo ponto verifica-se a diminuição de 1°C. Estes são indicativos de uma alteração da estabilidade do ácido nucleico, mas sendo essa alteração pouco qualitativa em termos de perceção do tipo de interação que acontece, não é possível afirmar

que este (pequeno) desvio seja significativo para se obter a informação necessária para se concluir algo sobre o tipo de interação que possa existir.

- 2) O flavílio 2 não parece influenciar muito a estabilidade de Poly (A: U), verificando-se desvios muito pequenos na temperatura de *melting*. Por comparação com outros resultados obtidos, por exemplo estudo de interação por RMN, tais resultados coincidem com os obtidos anteriormente pois o flavílio 2 apresenta baixa afinidade para com o Poly (A: U).
- 3) O flavílio 3 demonstra uma alteração de cerca de 3°C no primeiro ponto de T<sub>m</sub> e cerca de 2°C na segunda temperatura de *melting*. O flavílio em estudos anteriores demonstrou alterações que indicavam a sua interação com Poly (A: U). Esta alteração de T<sub>m</sub>, com base na informação descrita na seção I.1.5, poderá ser indicativa de uma interação com os *grooves* da molécula, mas mais estudos são necessários para confirmar tal afirmação.
- 4) Por seu lado, o flavílio 4 demonstra um comportamento bastante semelhante ao flavílio 3, tendo um desvio na primeira T<sub>m</sub> idêntico ao verificado para o flavílio 3, sendo que o desvio verificado na segunda T<sub>m</sub> é pouco significativo. Tal com o flavílio 3, os dados obtidos pelas titulações indicam alterações químicas do flavílio ao longo da titulação e tal pode explicar as diferenças observadas. O tipo de interação existente entre o flavílio 4 e Poly (A: U) poderá dar-se através dos *grooves* sendo esta possível interação interrompida maioritariamente na primeira T<sub>m</sub>, visto que as diferenças da segunda são mínimas.
- 5) Os resultados obtidos para a temperatura de *melting* do flavílio 5 com Poly (A: U) são os mais surpreendentes pois verifica-se uma alteração total no comportamento do *melting* do ácido nucleico. Este passa a assumir apenas uma temperatura de desnaturação o que pode ser indicativo de que o flavílio estabiliza o ácido nucleico, aquando da interação, de modo a que quando essa seja quebrada o ácido nucleico tende-se a desnaturar em 50% em vez de duas parcelas de 25%. Esta alteração verificada pode ser indicativa de uma interação entre bases, mas mais experiências serão necessárias para confirmar tal afirmação.



**Figura 84- Representação gráfica dos ajustes feitos com os resultados obtidos na medição de  $T_m$  de ctDNA.**

Os resultados obtidos demonstram que cada flavílio possui um comportamento distinto com ctDNA (figura 84). O ácido nucleico possui uma banda correspondente à temperatura de *melting* devido à sua composição, sendo que se verifica que 50% da cadeia está desnaturada e 50% encontra-se na forma de dupla cadeia. Esta dá-se quando a temperatura se encontra a cerca de 82°C. Nos resultados ilustrados para o ctDNA é preciso ter em conta que a temperatura de *melting* é definida pelo tamanho da cadeia, constituição, entre outros fatores, pelo que, pequenas variações podem dever-se apenas às propriedades do ácido nucleico e não devido à interação entre este e os flavílios. Os ajustes feitos aos resultados obtidos na medição das temperaturas de *melting* do ctDNA com os ácidos nucleicos (figura 84), transmitem que:

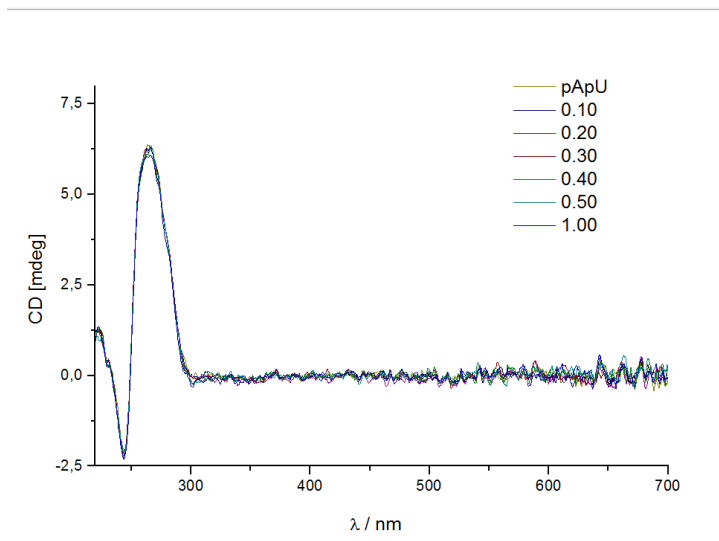
- 1) O ctDNA quando se encontra com o flavílio 1 em solução, sofre um aumento da sua  $T_m$  em cerca de 1°C. Comparando este resultado com outros obtidos anteriormente, é possível afirmar que o flavílio 1 ao interagir com o DNA, estabiliza a dupla cadeia, mas sendo essa estabilização baixa. Por analogia ao que foi dito e considerando que existe uma interação entre o flavílio e o ácido nucleico, como aferido por outra técnica, é possível que esta se dê através de uma interação do composto flavílio com os *grooves* do mesmo devido a verificar-se um baixo aumento da  $T_m$  do ctDNA.
- 2) Os resultados obtidos para o flavílio 2 não são os expectáveis. Analisando as deduções obtidas por outras técnicas (exemplos RMN), estas indicam a existência de uma interação entre o ácido nucleico e o flavílio, mas a experiência de *melting* demonstra uma ligeira diminuição da mesma o que é indicativo da uma destabilização da dupla cadeia não entrando em coerência com os resultados obtidos anteriormente. Como enunciado anteriormente, esta alteração pode dever-se apenas às propriedades das cadeias que se encontram em solução e não devido à interação entre as moléculas. Considerando este ponto, é possível que o tipo de interação que haja entre o flavílio 2 e o ctDNA se dê pelos *grooves*.

- 3) O flavílio 3 demonstra um comportamento muito semelhante ao verificado pelo 1. Deste modo e com recurso ao que foi observado pelas titulações, a interação entre o flavílio 3 e o ctDNA dar-se-á pelos *grooves* mas seriam necessários mais recursos para confirmar se é este o tipo de interação que se sucede.
- 4) Tal como o 2, a interação entre o flavílio 4 e o ctDNA apresenta uma diminuição da temperatura de estabilização do ácido nucleico e essa pode ser explicada com base no que foi dito anteriormente.
- 5) O flavílio 5, tal como os resultados apresentados com Poly (A: U), parece alterar muito a estabilidade de dupla cadeia de DNA, levando a um aumento da temperatura de *melting* de 82°C para 87° C. Este aumento significativo pode explicar o que foi observado aquando do estudo da titulação por emissão e absorção, onde foi aferido que este flavílio possivelmente teria um tipo de interação, como ctDNA, diferente dos outros flavílios e os resultados obtidos através do estudo da estabilização parecem confirmar essa afirmação. Deste modo, mas necessitando de mais estudos complementares, é possível que o flavílio 5 interaja com o ctDNA através da intercalação entre bases.



## IV.6- Dicroísmo circular

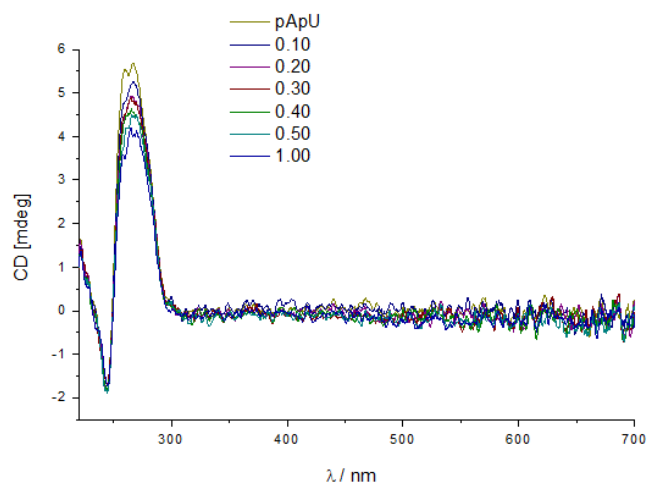
Através dos resultados fornecidos por Dicroísmo circular não é possível constatar grandes informações pois estes não apresentam os resultados esperados tendo em conta o que foi debatido na discussão.



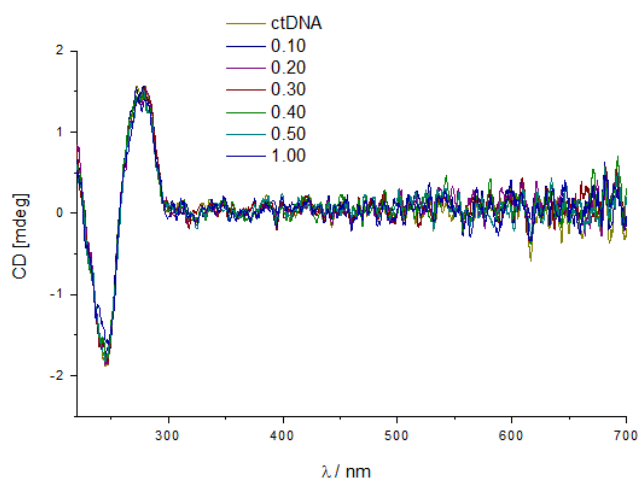
**Figura 85- Flavílio 3 com Poly (A: U)**

A figura 85 demonstra os resultados obtidos por dicroísmo circular onde não se visualiza qualquer alteração do espectro ao longo da titulação. Este resultados, como os obtidos nas titulações dos flavílio 1, 2, 3 e 4 com Poly (A: U) e ctDNA, poderão ser indicativos da formação de uma interação fraca entre os compostos e os ácidos nucleicos, sendo que novas medidas seriam necessárias para confirmar esta conclusão.

Por outro lado, mesmo sem se visualizar grandes alterações, os resultados do flavílio 5 com ctDNA e Poly (A: U)- Figura 86 e 87- demonstram alterações na região do comprimento de onda onde o flavílio possui o seu máximo de absorvância, sendo estes resultados indicativos de uma interação (efeito mais facilmente visualizado na titulação com Poly(A: U)).



**Figura 86- Flavílio 5 com Poly (A: U)**



**Figura 87- Flavílio 5 com ctDNA**

Tendo em conta os dados presentes nas figura 86 e 87 e os restantes resultados discutidos ao longo dos últimos capítulos, é de salientar as diferenças que o flavílio 5 apresenta perante os restantes flavílios em todas as técnicas, podendo este dado ser indicativo de que o flavílio 5 possui uma afinidade diferente em relação aos restantes, sendo que, e considerando que todos os flavílios interagem com os ácidos nucleicos estudados, a interação do flavílio 5 poderá ser uma intercalação entre bases enquanto que os restantes poderão interagir com os ácidos nucleicos através dos *grooves*.

## V- Conclusões

---

Os estudos de interação entre sondas moleculares e ácidos nucleicos, através da utilização de espectroscopias como Uv-Vis., fluorescência e ressonância magnética nuclear, permitem concluir sobre a possibilidade de existência de interação entre macromoléculas, e deste modo, obter uma percepção do tipo de influência química que existe entre duas moléculas quando se encontram em solução.

A partir da obtenção dos espectros de absorção e fluorescência das titulações realizadas, foi possível constatar que os flavílios 1, 2 e 4 ao serem titulados com os ácidos nucleicos (principalmente com Poly (A: U) e ctDNA), apresentam uma alteração do espectro de absorção associados a um desvio do comprimento de onda para a região do vermelho, sendo estes dados indicativos de que os flavílios (1,2 e 4) em solução com os ácidos nucleicos sofrem perturbações no seu ambiente químico e este dado é indicativo da existência de uma interação entre as moléculas. Por seu lado, os flavílios 3 e 5 não apresentam grandes alterações no comprimento de onda máximo de absorvância, pelo menos tão abruptas, mas as alterações a nível espectroscópico (diminuição da absorvância ao longo da titulação acoplado a um aumento da intensidade de fluorescência com exceção aos espectros de fluorescência do estudo do flavílio 5 com ctDNA) permitem concluir que existem alterações no comportamento dos flavílios, sendo estas indicativas de uma interação podendo esta ser diferente da verificada para com os flavílios 1,2 e 4. Os espectros de emissão obtidos para a titulação do flavílio 5 com ctDNA demonstram um comportamento completamente diferente do visualizado nas experiências de emissão, apresentando uma diminuição da intensidade de fluorescência ao longo da titulação (contrário ao verificado nos restantes dados obtidos por emissão), podendo este ser indicativo de que a interação entre as moléculas se dê de uma maneira distinta das restantes.

Os resultados obtidos nas titulações e a aplicação de modelos matemáticos, não permitem grandes conclusões das constantes de associação (K) entre flavílios e ácidos nucleicos pois os ajustes utilizados são de difícil manipulação possuindo grandes erros associados aos mesmos. Esta dificuldade foi observada tanto na manipulação dos modelos como nos resultados obtidos nas mesmas condições com aplicação de dois modelos diferentes originando resultados bastante distintos. Apesar da aplicação dos ajustes ser bastante difícil, os resultados obtidos pela utilização de várias derivações do modelo de *Sctachard* parecem possuir um melhor ajuste do que os restantes.

Os estudos de interação dos flavílios 1 e 2 por RMN, permitiram identificar os prótons dos mesmos que se encontram envolvidos na interação com Poly (A: U) e ctDNA. As titulações demonstraram que a substituição que distingue o flavílio 1 e 2 na posição 7' é o suficiente para alterar a afinidade do flavílio para com o ácido nucleico. O flavílio 1 demonstra uma afinidade superior com Poly (A: U), sendo que o flavílio 2 demonstra uma maior afinidade com o ctDNA. Deste modo, realizaram-se experiências de competição na tentativa de se estudar a competição entre os dois flavílios pelos sítios de ligação dos ácidos nucleicos, sendo espetável observar-se uma maior afinidade por parte do flavílio 2 com o ctDNA, ou seja, que os dados obtidos por 1D  $H^+$  RMN na competição indicassem um alargamento da banda representativa dos prótons deste

flavílio em detrimento dos protões do flavílio 1 mas tal não foi possível observar-se através dos resultados obtidos, observando-se a mesma situação para com Poly (A: U) (possuí maior afinidade com o flavílio 1 do que com o 2 mas não se verifica diferenças na competição).

Os tempos de vida dos flavílios na ausência/presença de ctDNA e Poly (A: U), possuem bastantes erros associados (observáveis pelos valores de  $\chi^2$ ) mas na sua generalidade indicam que o tempo de vida do flavílio (1- 277 ps; 2- 164 ps; 3-  $\approx$ 200 ps; 4- $\approx$  172 ps; 5- $\approx$  174 ps) aumentam na presença do ácido nucleico, ou seja, verificam-se alterações nas propriedades químicas do flavílio o que é indicativo de uma interação, comprovando os resultados obtidos nas titulações com Poly (A: U) e ctDNA.

A partir do estudo da estabilidade dos ácidos nucleicos (ctDNA e Poly (A: U)) com os 5 flavílios, é observável pequenas alterações na estabilidade dos ácidos nucleicos, podendo as mesmas estarem associadas ao tamanho da cadeia de ácido nucleico em solução (no caso do ctDNA). Nestes estudos, os resultados mais importantes estão relacionados com o flavílio 5 pois este, quer com ctDNA ou Pol (A: U), apresenta uma grande alteração na estabilidade dos ácidos nucleicos. Correlacionando estes dados obtidos com os de emissão e absorção especula-se que o flavílio 5, na presença de ctDNA e Poly (A: U), interaja de uma maneira completamente distinta dos outros flavílios, podendo essas diferenças inferir que alguns flavílios interagem através dos *grooves* e outros interagem por intercalação entre bases (flavílio 5) mas mais estudos seriam necessários para a obtenção de mais informação como seria o caso da realização de ensaios por ITC, por exemplo.

Os resultados obtidos por dicroísmo circular não possuem grande significativo pois não é possível observar as interações da forma que seria espectável. No entanto, é de salientar que o flavílio 5, tanto com Poly (A: U) como com ctDNA, demonstram alterações a nível espectral ao longo da titulação sendo esse dado indicativo de interação.

Em suma, o estudo de interação entre flavílios e ácidos nucleicos permite a deteção de novas sondas capazes de detetar diferentes tipos de DNA. Os resultados obtidos ao longo deste trabalho, parecem indicar que os flavílios utilizados interagem com os ácidos nucleicos, sendo que alguns flavílios (1, 2 e 4) apresentam um comportamento mais semelhante ao longo da titulação e outros possuem comportamentos completamente distintos (flavílio 5), podendo este comportamento ser indicativo de diferentes tipos de interação entre flavílios e os ácidos nucleicos. Para uma melhor perceção dos resultados obtidos e de modo a aferir o tipo de interação existente, seriam necessários obter mais dados de CD de modo a visualizar-se alterações do comportamento dos flavílios na presença de ácido nucleico.

## IV- Bibliografia

---

- [1] Chargaff, E. (1971) PREFACE TO A GRAMMAR OF BIOLOGY, *Science* 172, 637.
- [2] Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2002) *A Nucleic Acid Consists of Four Kinds of Bases Linked to a Sugar-Phosphate Backbone, Section 5.1*, 5th ed., NCBI Bookshelf, New York.
- [3] Watson, J. D., and Crick, F. H. C. (1953) MOLECULAR STRUCTURE OF NUCLEIC ACIDS - A STRUCTURE FOR DEOXYRIBOSE NUCLEIC ACID, *Nature* 171, 737-738.
- [4] Clausen-Schaumann, H., Rief, M., Tolksdorf, C., and Gaub, H. E. (2000) Mechanical stability of single DNA molecules, *Biophysical Journal* 78, 1997-2007.
- [5] Chargaff, E., Vischer, E., Doniger, R., Green, C., and Misani, F. (1949) THE COMPOSITION OF THE DESOXYRIBOSE NUCLEIC ACIDS OF THYMUS AND SPLEEN, *Journal of Biological Chemistry* 177, 405-416.
- [6] Shing Ho, P., and Carter, M. (01, August, 2011) *DNA Structure: Alphabet Soup for the Cellular Soul*, Dr Herve Seligmann ed., InTech.
- [7] Privalov, P. L., Dragan, A. I., Crane-Robinson, C., Breslauer, K. J., Remeta, D. P., and Minetti, C. (2007) What drives proteins into the major or minor grooves of DNA?, *Journal of Molecular Biology* 365, 1-9.
- [8] Oguey, C., Foloppe, N., and Hartmann, B. (2010) Understanding the Sequence-Dependence of DNA Groove Dimensions: Implications for DNA Interactions, *Plos One* 5.
- [9] Malinina, L., Fernandez, L. G., Huynh-Dinh, T., and Subirana, J. A. (1999) Structure of the d(CGCCCGCGGGCG) dodecamer: A kinked A-DNA molecule showing some B-DNA features, *Journal of Molecular Biology* 285, 1679-1690.
- [10] Miyahara, T., and Nakatsuji, H. (2015) Indicator of the Stacking Interaction in the DNA Double-Helical Structure: ChiraSac Study, *Journal of Physical Chemistry A* 119, 8269-8278.
- [11] Jeong, M., Lee, A. R., Kim, H. E., Choi, Y. G., Choi, B. S., and Lee, J. H. (2014) NMR study of the Z-DNA binding mode and B-Z transition activity of the Z alpha domain of human ADAR1 when perturbed by mutation on the alpha 3 helix and beta-hairpin, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 558, 95-103.
- [12] Wang, A. H. J., Quigley, G. J., Kolpak, F. J., Crawford, J. L., Vanboom, J. H., Vandermarel, G., and Rich, A. (1979) MOLECULAR-STRUCTURE OF A LEFT-HANDED DOUBLE HELICAL DNA FRAGMENT AT ATOMIC RESOLUTION, *Nature* 282, 680-686.
- [13] Berg, J., Tymoczko, J., and Stryer, L. (2002 ) *A Nucleic Acid Consists of Four Kinds of Bases Linked to a Sugar-Phosphate Backbone, Section 5.2*, 5th ed., NCBI Bookshelf

- [14] Nelson, D. L., and Cox, M. M. (2000) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers, Estados Unidos.
- [15] Turanli-Yildiz, B., Sezgin, T., Cakar, Z. P., Uslan, C., Sesalan, B. S., and Gul, A. (2011) The use of novel photobleachable phthalocyanines to image DNA, *Synthetic Metals* 161, 1720-1724.
- [16] Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., and Bobilya, D. J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, *Journal of Nutritional Biochemistry* 13, 572-584.
- [17] Kumar, S., and Pandey, A. K. (2013) Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview, *TheScientificWorldJournal* 2013, 162750.
- [18] Dixon, R. A., Achnine, L., Kota, P., Liu, C. J., Reddy, M. S. S., and Wang, L. J. (2002) The phenylpropanoid pathway and plant defence - a genomics perspective, *Molecular Plant Pathology* 3, 371-390.
- [19] Lila, M. A. (2004) Anthocyanins and human health: An in vitro investigative approach, *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 306-313.
- [20] Moncada, M. C., Pina, F., Roque, A., Parola, A. J., Maestri, M., and Balzani, V. (2004) Tuning the photochromic properties of a flavylum compound by pH, *European Journal of Organic Chemistry*, 304-312.
- [21] Pina, F., Petrov, V., and Laia, C. A. T. (2012) Photochromism of flavylum systems. An overview of a versatile multistate system, *Dyes and Pigments* 92, 877-889.
- [22] Pina, F., Oliveira, J., and de Freitas, V. (2015) Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations, *Tetrahedron* 71, 3107-3114.
- [23] Pina, F., Melo, M. J., Laia, C. A. T., Parola, A. J., and Lima, J. C. (2012) Chemistry and applications of flavylum compounds: a handful of colours, *Chemical Society Reviews* 41, 869-908.
- [24] Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., and Mateus, N. (2014) Bioavailability of anthocyanins and derivatives, *Journal of Functional Foods* 7, 54-66.
- [25] Gomes, R., Parola, A. J., Laia, C. A. T., and Pina, F. (2007) Promoting photochromism on flavylum derived 2-hydroxychalcones in aqueous solutions by addition of CTAB micelles, *Journal of Physical Chemistry B* 111, 12059-12065.
- [26] Petrov, V., Slavcheva, S., Stanimirov, S., and Pina, F. (2015) Origin of the Metastable Stability in Flavylum Multistate Systems, *Journal of Physical Chemistry A* 119, 2908-2918.

- [27] Moncada, M. C., Fernandez, D., Lima, J. C., Parola, A. J., Lodeiro, C., Folgosa, F., Melo, M. J., and Pina, F. (2004) Multistate properties of 7-(N,N-diethylamino)-4'-hydroxyflavylium. An example of an unidirectional reaction cycle driven by pH, *Organic & Biomolecular Chemistry* 2, 2802-2808.
- [28] Avó, J., Petrov, V., Basílio, N., Parola, A. J., and Pina, F. (2016) Evidence against the Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) model in 7-aminoflavylium derivatives *Dyes and Pigments*, 86-93.
- [29] Diniz, A. M., Basilio, N., Cruz, H., Pina, F., and Parola, A. J. (2015) Spatiotemporal control over the co-conformational switching in pH-responsive flavylium-based multistate pseudorotaxanes, *Faraday Discussions* 185, 361-379.
- [30] Owen, T. (2000) *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*, 3-6, 1st ed., Agilent Technologies, Alemanha.
- [31] Owen, T. (2000) *Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy*, 13-20, 1st ed., Agilent Technologies, Alemanha.
- [32] Dr. Valeur, B., and Berberan-Santos, M. N. (2012) *Molecular Fluorescence*, Second ed., WILEY-VCH, Alemanha.
- [33] Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L., and Cabrita, E. J. (2011) Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding, *Journal of Chemical Education* 88, 990-994.
- [34] Rossi, C., Donati, A., and Sansoni, M. R. (1992) NUCLEAR-MAGNETIC-RESONANCE AS A TOOL FOR THE IDENTIFICATION OF SPECIFIC DNA-LIGAND INTERACTION, *Chemical Physics Letters* 189, 278-280.
- [35] Blazquez-Sanchez, M. T., Marcelo, F., Fernandez-Alonso, M. D., del Villar-Guerra, R., Samadi, A., Canada, F. J., Jimenez-Barbero, J., and Vicent, C. (2015) D- and L-Mannose-Containing glyco-Oligoamides Show Distinct Recognition Properties When Interacting with DNA, *European Journal of Organic Chemistry*, 6180-6193.
- [36] Garbett, N. C., Ragazzon, P. A., and Chaires, J. B. (2007) Circular dichroism to determine binding mode and affinity of ligand-DNA interactions, *Nature Protocols* 2, 3166-3172.
- [37] Tumir, L. M., Crnolatac, I., Deligeorgiev, T., Vasilev, A., Kaloyanova, S., Branilovic, M. G., Tomic, S., and Piantanida, I. (2012) Kinetic Differentiation between Homo- and Alternating AT DNA by Sterically Restricted Phosphonium Dyes, *Chemistry-a European Journal* 18, 3859-3864.
- [38] Healy, E. F. (2007) Quantitative determination of DNA-ligand binding using fluorescence spectroscopy, *Journal of Chemical Education* 84, 1304-1307.

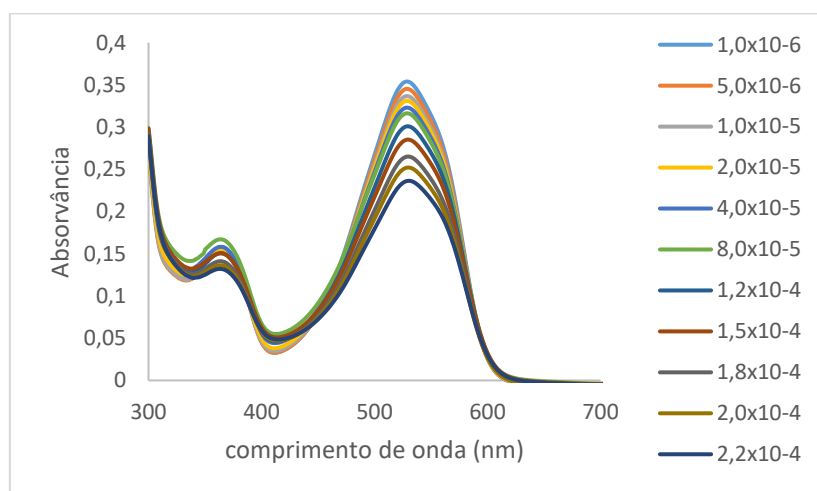


[39] McGhee, J. D., and Hippel, P. H. V. (1974) THEORETICAL ASPECTS OF DNA-PROTEIN INTERACTIONS - COOPERATIVE AND NON-COOPERATIVE BINDING OF LARGE LIGANDS TO A ONE-DIMENSIONAL HOMOGENEOUS LATTICE, *Journal of Molecular Biology* 86, 469-489.

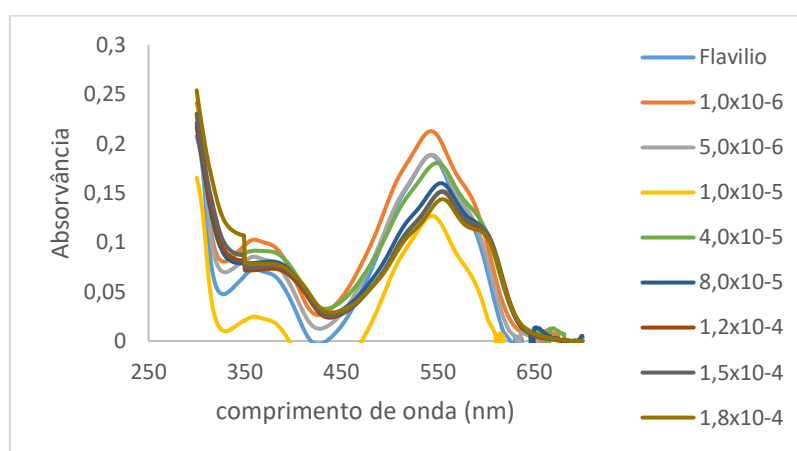
[40] Haque, L., Pradhan, A. B., Bhuiya, S., and Das, S. (2015) Exploring the comparative binding aspects of benzophenanthridine plant alkaloid chelerythrine with RNA triple and double helices: a spectroscopic and calorimetric approach, *Physical Chemistry Chemical Physics* 17, 17202-17213.

## VII- Anexos

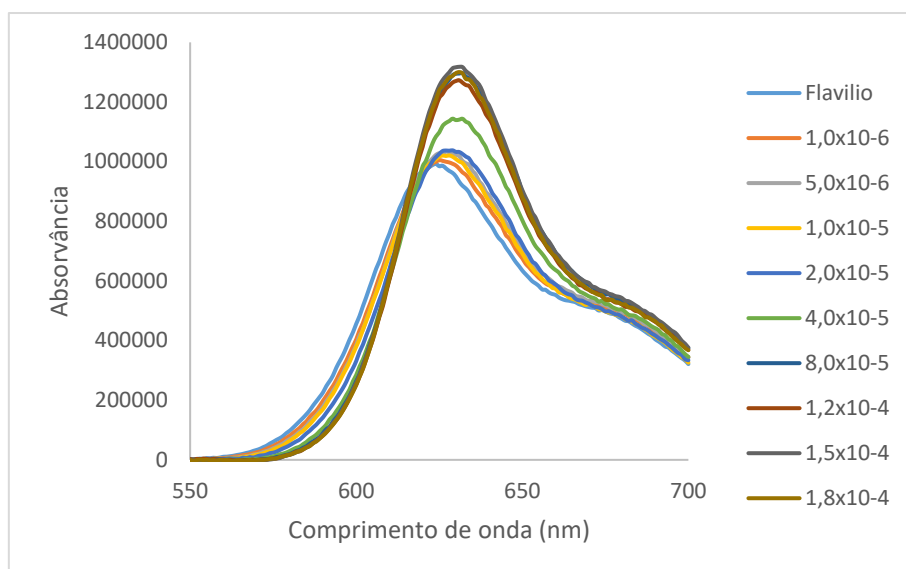
---



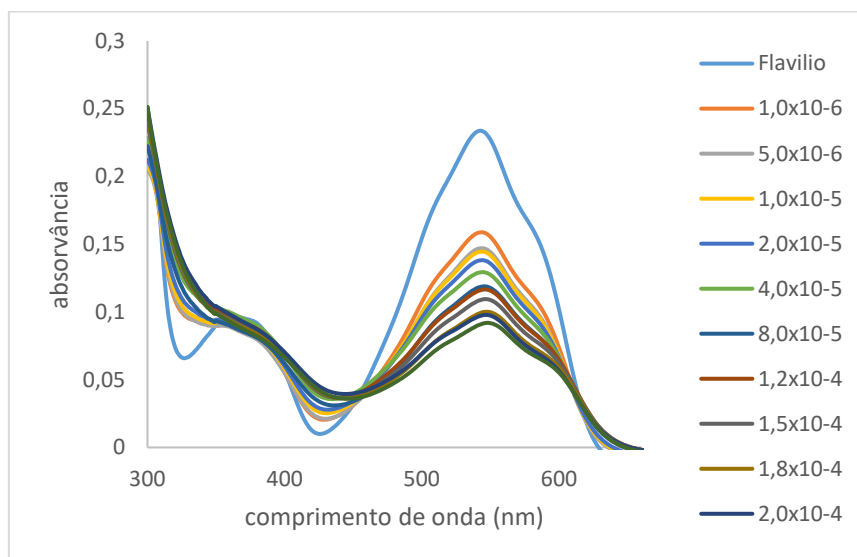
**Anexo 1- Titulação flavílio 1 comPoly (G: C)**



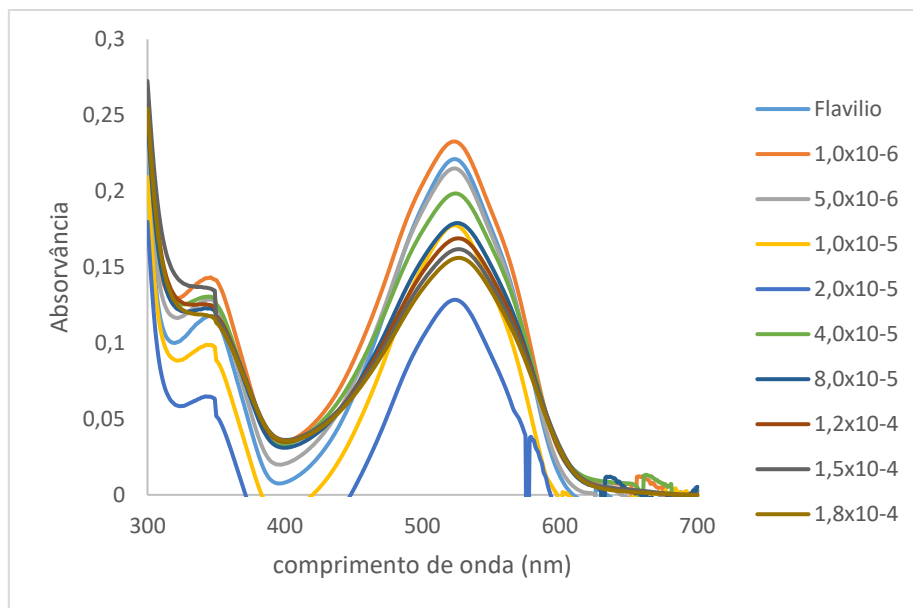
**Anexo 2- Titulação flavílio 2 com Poly (A: T)**



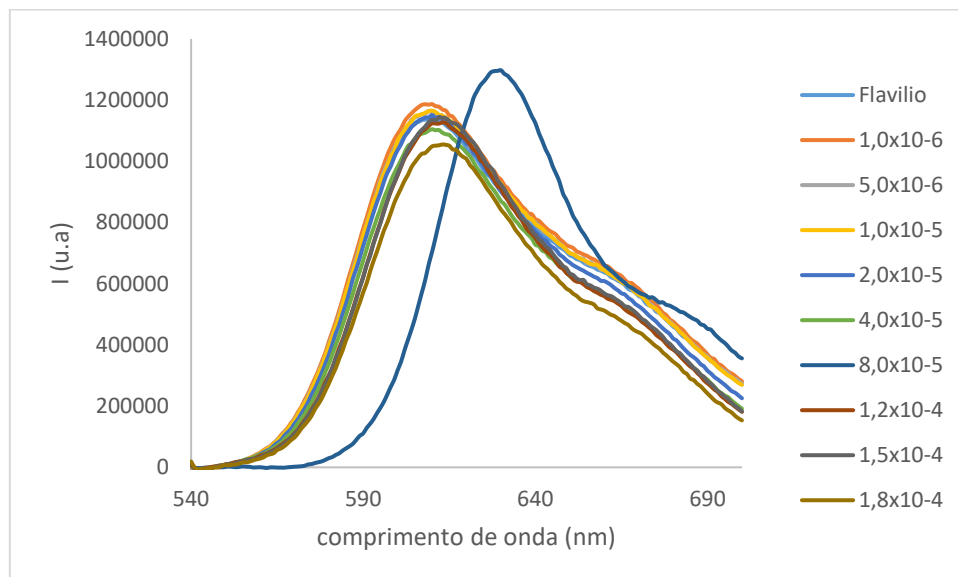
**Anexo 3- Titulação flavílio 2 comPoly (A: T)**



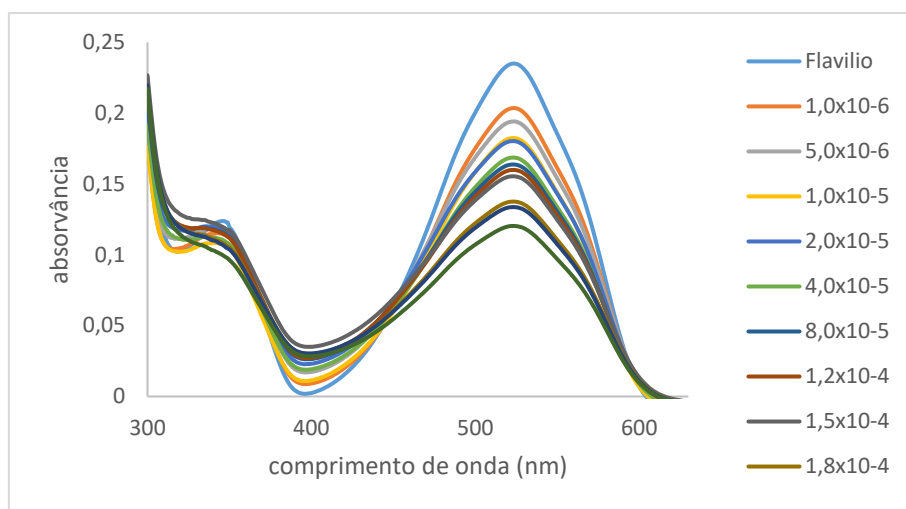
**Anexo 4- Titulação flavílio 2 comPoly (G: C)**



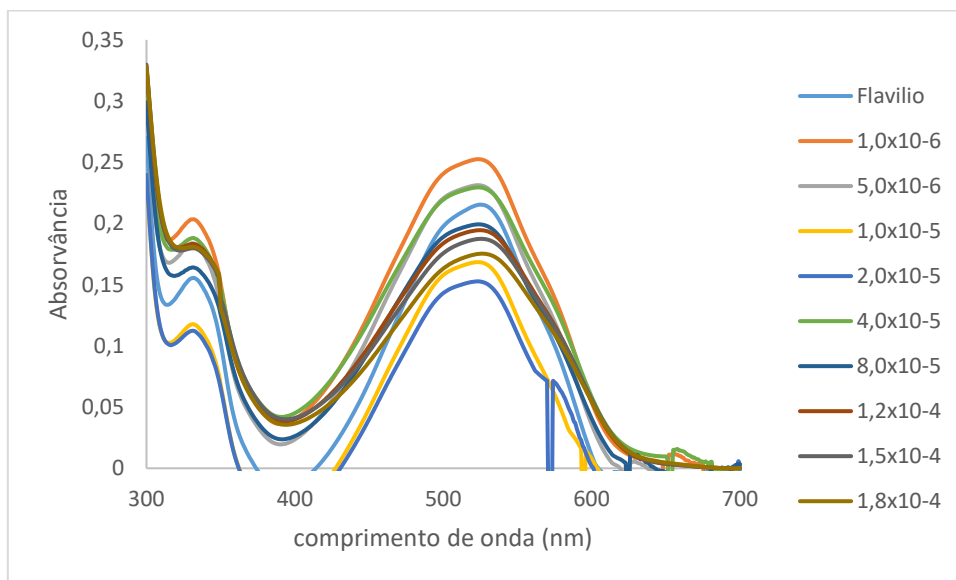
**Anexo 5- Titulação flavílio 3 comPoly (A: T)**



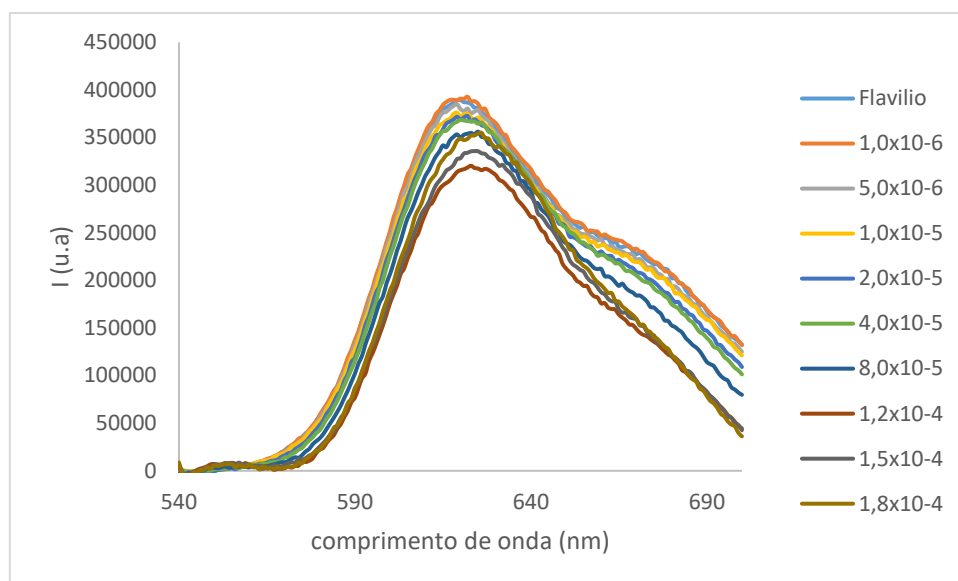
**Anexo 6- Titulação flavílio 3 comPoly (A: T)**



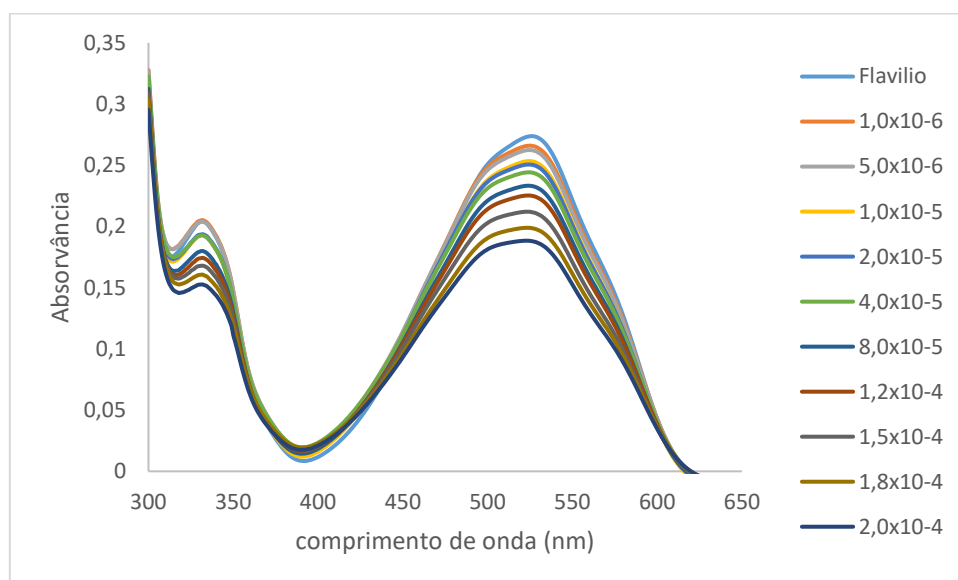
**Anexo 7- Titulação flavílio 3 com Poly (G: C)**



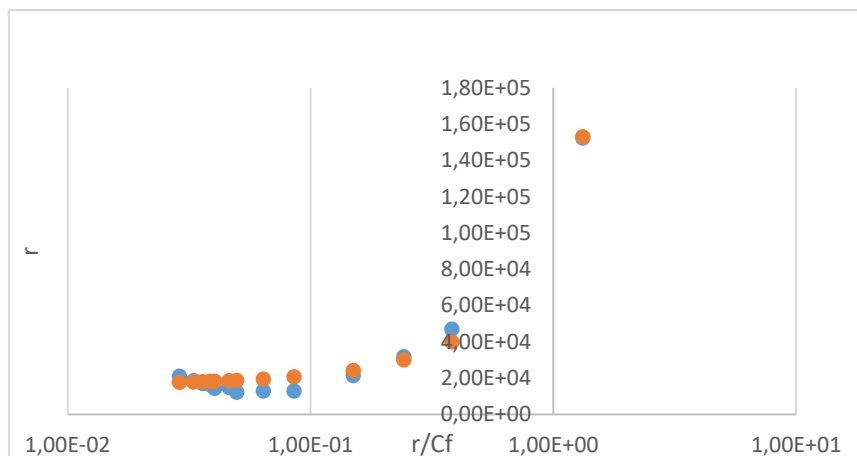
**Anexo 8- Titulação flavílio 5 com Poly (A: T)**



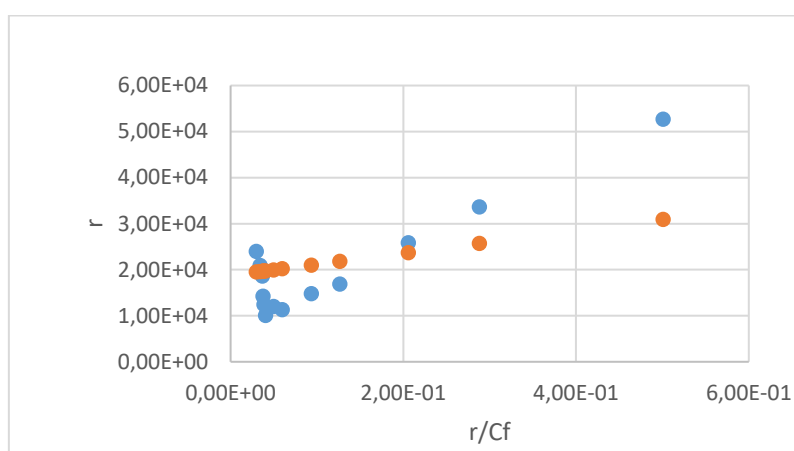
**Anexo 9- Titulação flavílio 5 com Poly (A: T)**



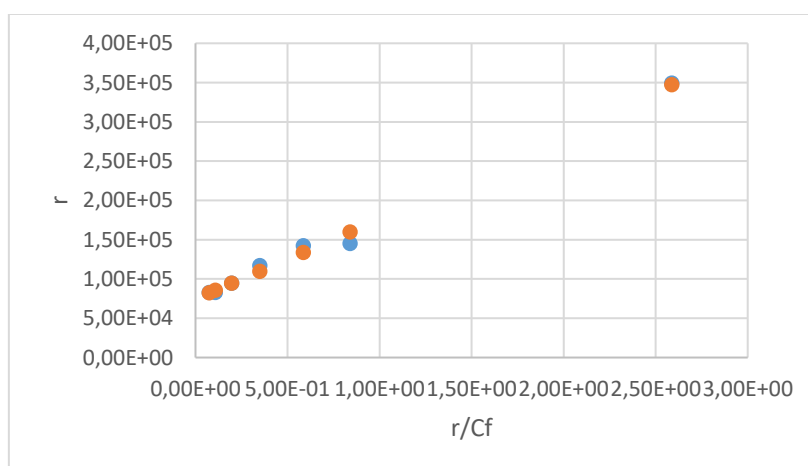
**Anexo 10- Titulação flavílio 5 com Poly (G: C)**



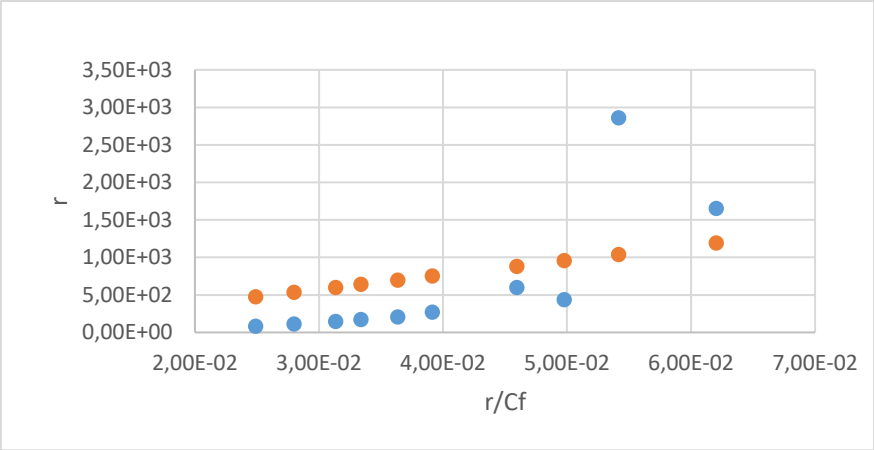
**Anexo 11- Ajuste de Von Hippel Flavílio 1 com Poly (A: U)**



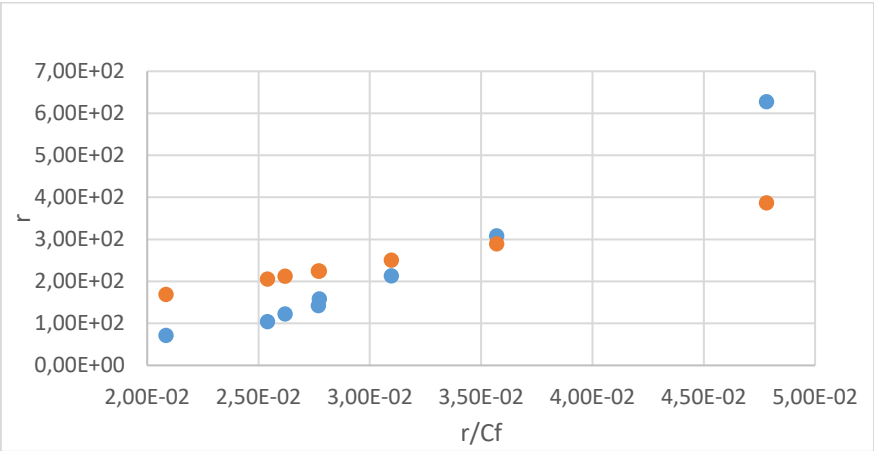
**Anexo 12- Ajuste de Von Hippel Flavílio 1 com ctDNA**



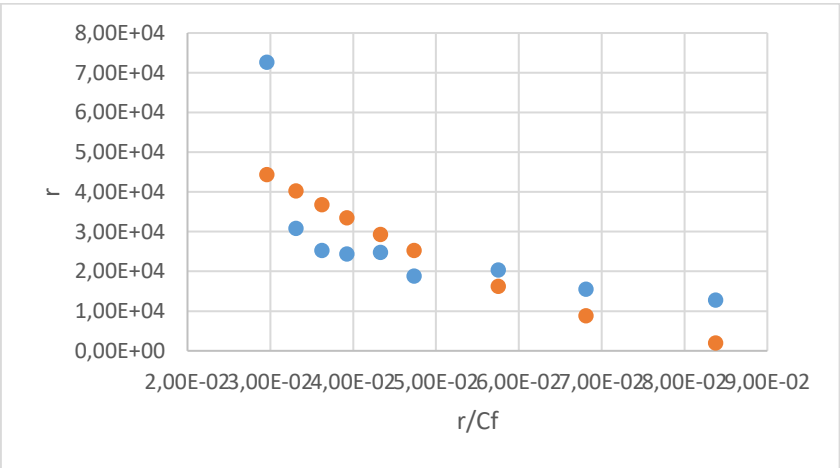
**Anexo 13- Ajuste de Von Hippel Flavílio 2 com Poly (A: U)**



Anexo 14- Ajuste de Von Hippel Flavílio 2 com ctDNA



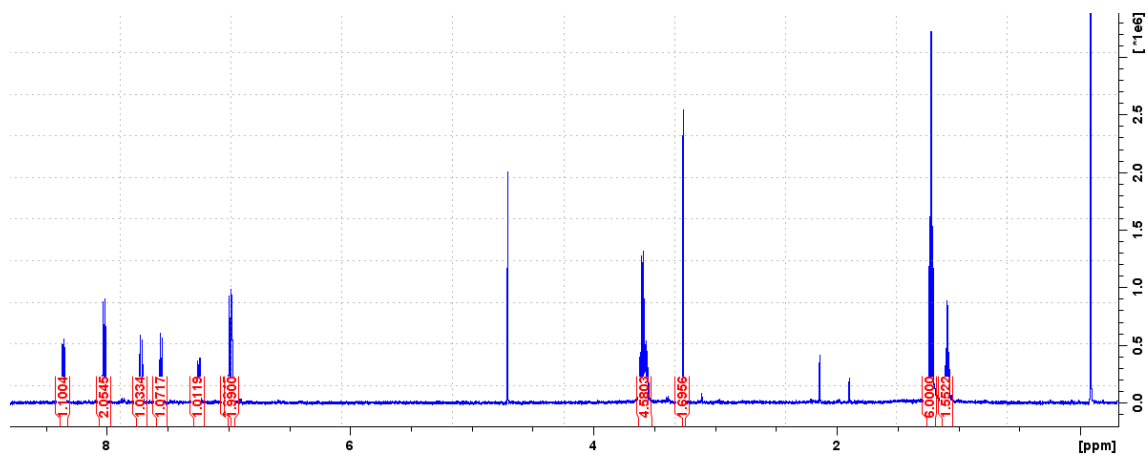
Anexo 15- Ajuste de Von Hippel Flavílio 3 com Poly (A: U)



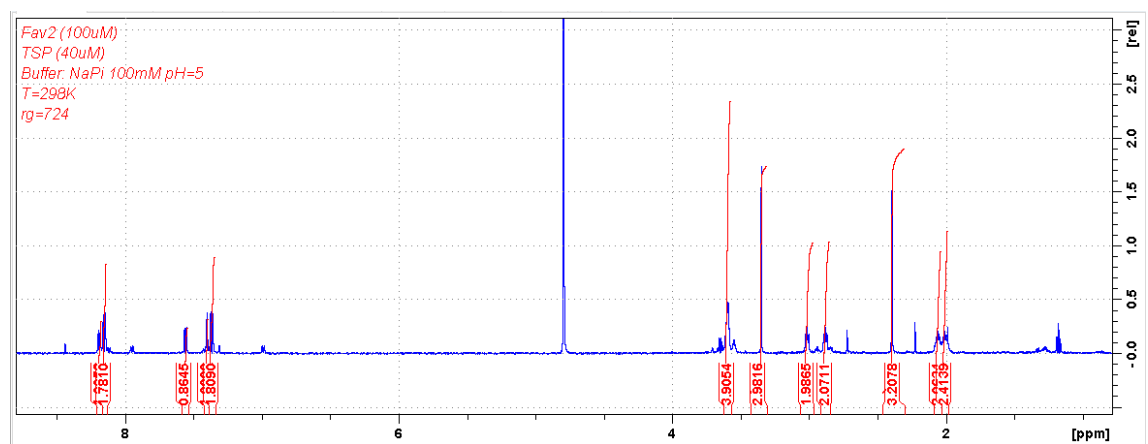
Anexo 16- Ajuste de Von Hippel Flavílio 4 com Poly (A: U)



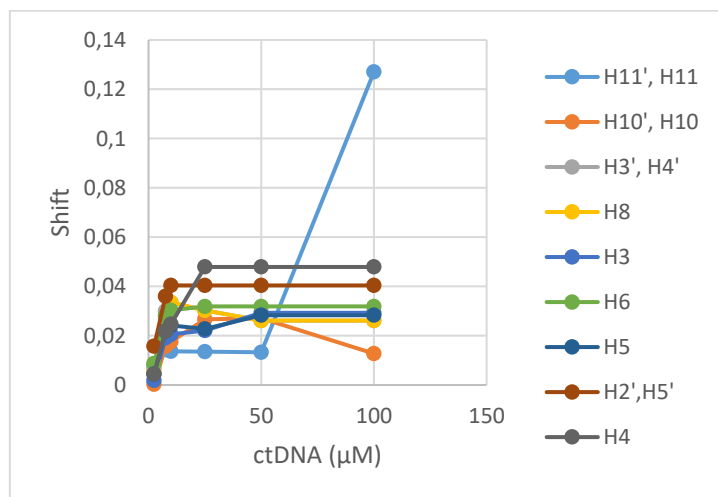




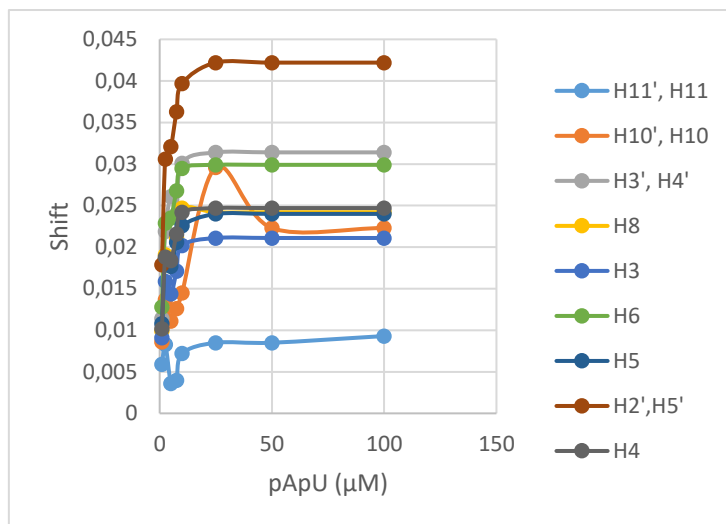
Anexo 20- Espectro 1D H RMN Flavílio 1.



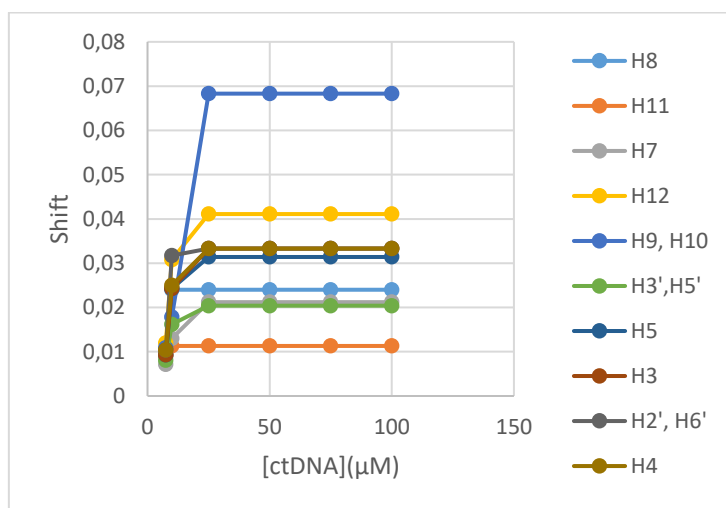
Anexo 21- - Espectro 1D H RMN Flavílio 2.



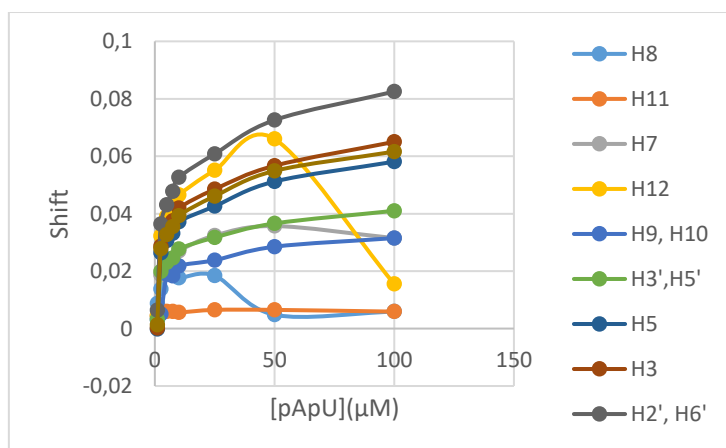
Anexo 22- Desvios visualizados ao longo da titulação por 1D H RMN flavilio 1.



Anexo 23- Desvios visualizados ao longo da titulação por 1D H RMN flavilio 1.



Anexo 24- Desvios visualizados ao longo da titulação por 1D H RMN flavilio 2.



Anexo 25- Desvios visualizados ao longo da titulação por 1D H RMN flavilio 2.

[pApU] ( $\mu$ M)	H11', H11	H10', H10	H3', H4'	H8	H3	H6	H5	H2',H5'	H4
2,5	0,7702	0,7407	0,8575	0,7407	0,731	0,7553	0,6986	0,7335	0,6784
10	0,7038	0,7177	0,8305	0,8979	0,5406	0,9246	0,8806	0,8806	0,9337

**Anexo 26- Valores de alargamento de banda obtidos na experiência de competição- Flavílio 1.**

[pApU] ( $\mu$ M)	H8	H11	H7	H12	H9,H10	H3',H5'	H5	H3	H2', H6'	H4
2,5	0,8166	0,8087	0,7854	0,7124	0,8246	0,7627	0,7264	0,6986	0,7193	0,7193
10	0,6969	0,7462	0,7177	0,792	0,7247	0,8065	0,746	0,9245	0,9804	0,9337

**Anexo 27- Valores de alargamento de banda obtidos na experiência de competição- Flavílio 1.**

Tampão Universal	
2,25 mL	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 85%
7,00 g	Ácido cítrico monohidratado
3,45 g	Ácido Bórico
343 mL	NaOH 1M
Perfazer 1 L com água miliQ	

**Anexo 28- Constituição do tampão universal.**